

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

LAÍS BENVENUTTI

AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE
MAÇÃ COM ETANOL PARA APLICAÇÃO EM SIDRA

PONTA GROSSA

2018

LAÍS BENVENUTTI

AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE
MAÇÃ COM ETANOL PARA APLICAÇÃO EM SIDRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pertencente ao Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito exigido para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Alberti

PONTA GROSSA

2018

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

B478 Benvenuto, Laís
Avaliação da extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã com etanol para aplicação em Sidra/ Laís Benvenuto. Ponta Grossa, 2018. 99f.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Aline Alberti.

1.Método de superfície de resposta (RSM). 2.Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 3.Atividade antioxidante. 4.Análise sensorial. 5.Subproduto. I.Alberti, Aline. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e Tecnologia de

CDD: 663.1

TERMO DE APROVAÇÃO

LAÍS BENVENUTTI

AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE MAÇÃ COM ETANOL PARA APLICAÇÃO EM SIDRA.

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:

Orientadora:


Prof.^a Dr.^a Aline Alberti – UEPG /PR


Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski – UFSC


Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk – UTFPR


Prof. Dr. Alessandro Nogueira – UEPG /PR

Ponta Grossa, 02 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sido minha fortaleza;

Aos meus pais, Cledilson e Rosane Benvenuti e à Flávia Benvenuti, pelo amor incondicional, apoio e incentivo em todos os momentos;

Aos meus familiares, especialmente minhas avós, por toda dedicação;

Ao Felipe Cavasotti, por apoiar e me acompanhar nessa jornada;

A professora Dr.^a Aline Alberti, minha orientadora, pela amizade, paciência e conhecimentos transmitidos. Aos professores Dr. Acácio A. F. Zielinski e Dr. Alessandro Nogueira que tanto contribuíram com informações que auxiliaram na concretização deste trabalho;

À Débora Bortolini pela amizade, companheirismo e auxílio em qualquer situação;

À professora Dr.^a Renata D. S. Salém que participou das bancas de projeto e qualificação, colaborando com a melhoria desta pesquisa e ao professor Dr. Charles W. I. Haminiuk que prontamente aceitou avaliar e contribuir com o trabalho;

À Isabela Ronchi e Thaís Fisher, alunas de iniciação científica, que acompanharam e auxiliaram em algumas análises;

Aos colegas do Grupo de Trabalho sobre Maçãs e da Escola Tecnológica de Leite e Queijos dos Campos Gerais, pois todos, de alguma forma, contribuíram para a elaboração desse estudo;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela infraestrutura;

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa!

RESUMO

A maçã apresenta alta concentração de compostos fenólicos, distribuídos em diferentes classes as quais apresentam capacidade antioxidante. Além disso, conferem efeito positivo na formação do sabor, cor e aroma em bebidas derivadas da fruta. No entanto, durante o processamento, parte da composição fenólica fica retida no bagaço, principal subproduto da agroindústria da maçã. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a otimização da extração de compostos fenólicos presentes no bagaço da maçã utilizando solvente de grau alimentício, visando sua aplicação em sidras a fim de melhorar as características tecnológicas, nutricionais e sensoriais do produto final. Nos ensaios de extração foram avaliados os efeitos da concentração de solvente (etanol), temperatura e razão sólido/líquido sobre o rendimento e atividade antioxidante dos extratos, utilizando o método de superfície de resposta (MSR). Além disso, foi estudada a cinética da extração, bem como a estabilidade do extrato. A análise de regressão linear múltipla acoplada ao MSR sugeriu que a extração seja efetuada utilizando etanol 60%, a 50 °C, na razão sólido/líquido de 1:20 (m/v). Por meio de um modelo cinético de primeira ordem foram avaliados os efeitos do tempo e da temperatura sobre a concentração de equilíbrio da extração, a qual foi atingida aproximadamente aos 50 minutos, independente da temperatura, com teores de 1852,77; 1728,35 e 1265,29 mg CAT/kg para as temperaturas de 50, 35 e 20 °C, respectivamente. A partir desses resultados, a energia de ativação necessária para que ocorra a transferência do soluto foi 9,01 kJ/mol. Em geral, os flavonoides apresentaram boa estabilidade durante período de 90 dias, sendo sugerido armazenamento ou aplicação sob temperatura de 10 °C em pH de aproximadamente 3,5. O extrato obtido nas melhores condições foi adicionado ao mosto antes do inóculo de levedura e a fermentação foi monitorada por meio do estudo cinético. Os mostos e pontos da fermentação (1, 4, 7, 11 e 15 dias) foram avaliados quanto aos fenóis individuais, açúcares e etanol em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, foi avaliada a composição fenólica total, flavonoides totais, flavanóis, flavonóis e atividade antioxidante, bem como, o teor de acidez total titulável, pH e cor. Os produtos finais foram analisados sensorialmente quanto à intensidade de cor, acidez, adstringência e amargor por meio de uma escala estruturada, e quanto à qualidade do odor em escala hedônica de aceitação. A adição do extrato aumentou cerca 40% a concentração de flavonoides totais, apresentando glicosídeos de quercetina, compostos presentes apenas no epicarpo da maçã, os quais foram um dos compostos relacionados com o aumento da atividade antioxidante na sidra com adição de extrato. A adição do extrato também resultou em maior intensidade de cor e percepção do amargor e adstringência. Apesar das alterações na composição fenólica, a adição do extrato não prejudicou a qualidade do odor do produto final. Portanto, o extrato fenólico obtido com etanol em condições otimizadas foi capaz de reincorporar parte dos compostos bioativos retidos no bagaço, aumentando a capacidade antioxidante e alterando características sensoriais responsáveis pela aceitabilidade da bebida.

Palavras chave: Método de superfície de resposta (RSM); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); atividade antioxidante; análise sensorial; subproduto.

ABSTRACT

Apple has high amounts of phenolic compounds, distributed in different classes which show antioxidant capacity. In addition, the phenolic compounds contribute to flavor, color and aroma in apple beverages. However, most of the phenolic compounds, especially the flavonoids, are retained in the apple pomace, during processing. In this way, this work aimed to optimize the flavonoids extraction from apple pomace using food grade solvent, and to apply the extracts in ciders in order to improve the technological, nutritional and sensorial characteristics of the final product. In the extraction experiments, the effects of solvent concentration (ethanol), temperature and solid/liquid ratio on process yield and antioxidant activity of the extracts were evaluated using response surface methodology (RSM). In addition, the extraction kinetics as well as the stability of the extract were studied. The multiple linear regression analysis coupled to RSM suggested that the extraction be performed using ethanol 60% at 50 °C and with solute-solvent ratio of 1:20 (w/v). The effects of time and temperature on the equilibrium concentration of the extraction were evaluated, which was reached at approximately 50 minutes with contents of 1852.77; 1728.35 and 1265.29 mg CAT/kg for the temperatures of 50, 35 and 20 °C, respectively. The activation energy required for solute transfer to occur was determined, 9.01 kJ mol⁻¹. In general, the flavonoids showed good stability during the period of 90 days, being suggested its storage or application under a temperature of 10 °C and pH about 3.5. The extract obtained under the best conditions was added to the must prior to addition of the yeast inoculum and the fermentation was monitored by kinetic study. The musts and ciders (1, 4, 7, 11 and 15 days) were evaluated as to the individual phenols and sugar and ethanol contents were quantified in high performance liquid chromatography (HPLC). In addition, the total phenolic composition, total flavonoids, flavanols, flavonols and antioxidant activity, as well as total titratable acidity, pH and color were evaluated. The final products were sensorially analyzed for color intensity, acidity, astringency and bitterness by means of a structured scale. The odor quality was evaluated in a hedonic scale of acceptance. The addition of the extract increased about 40% in the total flavonoid content. Quercetin glycosides, compounds present only in the apple epicarp, were found, being one of the compounds associated for the increase in antioxidant activity. The cider with the extract addition showed higher intensity of color and perception of the bitterness and astringency. Despite the changes in phenolic composition, the addition of the extract did not affect the odor quality of the final product. Therefore, the phenolic extract obtained with ethanol under optimized conditions was able to reincorporate bioactive compounds retained in the pomace, increasing the antioxidant capacity and changing sensorial characteristics responsible for the acceptability of the beverage.

Keywords: Response surface method (RSM); high performance liquid chromatography (HPLC); antioxidant activity; sensory analysis; by-product.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 Estrutura do ácido clorogênico, principal composto fenólico presente em maçãs.	19
Figura 1.2 Estrutura dos principais compostos fenólicos presentes em maçãs.....	21
Figura 1.3 Estrutura básica de um flavonoide.....	26
Figura 1.4 Esquema das reações ocorridas pelas diferentes formas de atuação de antioxidantes.....	28
Figura 2.1 Superfície de resposta mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a concentração de flavonoides totais.....	48
Figura 2.2 Efeito das variáveis tempo e temperatura no rendimento da extração de flavonoides totais do bagaço de maçã.....	51
Figura 2.3 Efeito da temperatura e pH no teor de flavonoides totais dos extratos durante o período de 90 dias de armazenamento	53
Figura 3.1 Fluxograma da elaboração do mosto de maçã, extrato fenólico do bagaço e sidra com e sem adição de extrato fenólico	61
Figura 3.2 Esquema do sistema de fermentação demonstrando os dias em que a fermentação foi interrompida para monitoramento dos efeitos da adição do extrato fenólico.....	61
Figura 3.3 Fichas para avaliação sensorial.....	65
Figura 3.4 Teores de açúcares (sacarose, glucose e frutose), etanol e sorbitol durante os dias da fermentação com e sem adição de extrato fenólico...68	
Figura 3.5 Efeito da fermentação com e sem adição de extrato sobre os teores de compostos fenólicos	74
Figura 3.6 Projeção da avaliação dos atributos sensoriais formada pelos componentes 1 e 2	79
Figura 3.7 Gráfico radar mostrando as diferenças sensoriais das sidras I e II.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para a extração dos compostos fenólicos do bagaço da maçã.....	39
Tabela 2.2 Parâmetros cromatográficos dos padrões fenólicos utilizados.....	42
Tabela 2.3 Concentração de flavonoides totais, flavonóis totais, flavanóis totais e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS nos quinze experimentos de extração.....	44
Tabela 2.4 Efeitos das variáveis independentes (concentração de solvente, temperatura e razão soluto/solvente) sobre a atividade antioxidante os teores de flavonoides e suas subclasses nos extratos obtidos.	46
Tabela 2.5 Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração.....	49
Tabela 2.6 Perfil fenólico do extrato do bagaço da maçã expresso em mg do composto por quilograma de bagaço seco.....	49
Tabela 2.7 Parâmetros obtidos no modelo cinético de primeira ordem.....	52
Tabela 3.1 Parâmetros cromatográficos dos padrões de açúcares e etanol utilizados	64
Tabela 3.2 Parâmetros cinéticos da fermentação das sidras I e II.	67
Tabela 3.3 Valores referentes ao pH e acidez durante o período de 15 dias de fermentação.....	69
Tabela 3.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante durante a fermentação do mosto de maçã com e sem adição de extrato.	71
Tabela 3.5 Parâmetros da análise colorimétrica durante os dias de fermentação. ..	77

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
C_{eq}	Concentração de equilíbrio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAM	Extração assistida por micro-ondas
EAU	Extração assistida por ultrassom
ELP	Extração assistida por líquido pressurizado
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
GSH	Glutathione
GSH-Px	Glutathione peroxidase
GSH-Rd	Glutathione reductase
HPR	Hidroxifenilpropionica descarboxilase
k	Constante de transferência de massa
Mosto I	Mosto controle
Mosto II	Mosto com adição de extrato fenólico
MSR	Método de superfície de resposta
PAR	Ácido fenólico reductase
RAD	Ácido fenólico descarboxilase
Sidra I	Sidra controle
Sidra II	Sidra com adição de extrato fenólico
SOD	Superóxido dismutase
TAH	Transferência do átomo de hidrogênio
TE	Transferência de elétron
VRP	Vinil fenol reductase

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	11
Capítulo 1: Revisão de literatura	12
1.1 MAÇÃ	13
1.2 AGROINDÚSTRIA DA MAÇÃ	14
1.2.1 Suco	14
1.2.2 Sidra	15
1.2.3 Bagaço	17
1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	18
1.3.1 Composição fenólica da maçã.....	20
1.3.2 Efeito do processamento na composição fenólica.....	22
1.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	24
1.4.1 Determinação da capacidade antioxidante total	27
1.5 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DA MAÇÃ ...	28
1.5.1 Cinética da extração.....	30
1.5.2 Otimização da extração	30
1.6 ESTABILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	31
Capítulo 2: Otimização e estudo cinético da extração e estabilidade do extrato fenólico do bagaço da maçã utilizando etanol como solvente	33
2.1 INTRODUÇÃO.....	35
2.2 MATERIAS E MÉTODOS.....	37
2.2.1 Materiais	37
2.2.2 Métodos.....	37
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
2.3.1 Caracterização dos extratos	44
2.3.2 Otimização e validação.....	45
2.3.3 Compostos fenólicos individuais.....	49
2.3.4 Cinética da Extração.....	50
2.3.5 Estabilidade	52
2.4 CONCLUSÃO	55
Capítulo 3: Efeito da reincorporação de flavonoides do bagaço de maçã no processo fermentativo da sidra	56
3.1 INTRODUÇÃO.....	58
3.2 MATERIAS E MÉTODOS.....	59
3.2.1 Materiais	59
3.2.2 Métodos.....	59
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
3.3.1 Cinética da fermentação.....	67
3.3.2 Composição fenólica e atividade antioxidante.....	70
3.3.3 Cor.....	76
3.3.4 Avaliação sensorial.....	78
3.4 CONCLUSÃO	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS	84

INTRODUÇÃO

Maçãs e seus produtos podem ser considerados boas fontes de antioxidante devido à concentração e composição de compostos fenólicos. Esses compostos apresentam capacidade de atuar contra o efeito oxidativo o que está relacionado ao envelhecimento precoce e certas doenças, tais como cardíacas, coronárias, neurodegenerativas, diabetes e câncer. Além disso, estão implicados na adstringência, amargor, cor e formação de aromas, critérios sensoriais envolvidos na definição dos padrões de qualidade de sucos e sidras.

Durante o processamento, a concentração fenólica diminui, principalmente, devido às reações de oxidação enzimática e retenção no bagaço, principal subproduto obtido após a etapa de prensagem para obtenção do suco ou mosto, o qual representa mais de 25% do total de maçã processada e pode conter cerca de 50% do conteúdo fenólico da fruta intacta. Dessa forma, esses compostos podem ser recuperados do bagaço, por meio de ensaios de extração. Para que o extrato possa ser utilizado em produtos alimentícios, durante a escolha do solvente deve-se levar em conta que seja permitida a sua adição em alimentos, uma vez que a etapa de evaporação não elimina totalmente o solvente. Além disso, a otimização das condições do processo se faz necessária a fim de obter o melhor rendimento possível.

No Brasil, a produção de maçã está voltada ao consumo *in natura*. Os frutos que apresentam características fora dos padrões destinam-se ao processamento. Dessa forma, as sidras, um dos principais produtos derivados dessa fruta, são elaboradas com maçãs de mesa, resultando em características diferentes das sidras provenientes de maçãs industriais específicas, as quais apresentam, entre outros aspectos, alta concentração de compostos fenólicos. Dessa forma, os flavonoides recuperados podem ser reincorporados ao mosto a fim de aumentar a capacidade antioxidante da bebida e alterar características sensoriais.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo otimizar e estudar a cinética de extração de compostos fenólicos do bagaço da maçã, utilizando solventes de grau alimentício, a fim de aplicar no mosto e avaliar seus efeitos durante o processo fermentativo para a produção de sidra.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Otimizar a extração dos compostos fenólicos do bagaço da maçã e *avaliar* o efeito da sua adição na fermentação alcoólica e nos aspectos sensoriais da sidra.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Otimizar* a concentração de solvente, temperatura e razão sólido-líquido no processo de extração de compostos fenólicos do bagaço da maçã utilizando etanol como solvente;
- *Estudar* a cinética de extração dos compostos fenólicos do bagaço de maçã;
- *Verificar* a estabilidade do extrato fenólico durante o armazenamento;
- *Avaliar* o efeito da adição de extrato fenólico do bagaço na cinética de fermentação alcoólica do mosto de maçã;
- *Monitorar* a capacidade antioxidante bem como o perfil fenólico durante a fermentação alcoólica;
- *Avaliar* o efeito da adição do extrato na qualidade sensorial da sidra.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 MAÇÃ

A maçã (*Malus domestica* Borkh), pertencente à família *Rosaceae*, atingiu produção mundial de 89,3 milhões de toneladas no ano de 2016, sendo cultivada principalmente na China, a qual abrange cerca de 49% da produção (FAOSTAT, 2017). No Brasil, o primeiro cultivo comercial foi registrado em 1969, em Fraiburgo-SC, com mudas vindas da França (ABPM, 2016). A produção brasileira, concentrada na região sul do país (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), atinge cerca de 1,2 milhões de toneladas, o que coloca o Brasil como terceiro maior produtor da América do Sul, atrás apenas do Chile e da Argentina (FAOSTAT, 2017). O estado de Santa Catarina produziu 611,78 mil toneladas na safra de 2014/15 (ABPM, 2016), correspondendo a 51% da produção brasileira. Segundo a Associação Brasileira de Produtores da Maçã (ABPM, 2016), a maior parte da produção brasileira está voltada para as cultivares Gala e Fuji, as quais, juntas, compreendem mais de 90% da produção total de maçã. No entanto, variedades com menor exigência ao frio vêm sendo produzidas por meio de novas tecnologias de irrigação e manejo no nordeste brasileiro (EMBRAPA, 2014).

O consumo de maçã vem aumentando a nível mundial (BRASIL, 2013), provavelmente devido ao aumento populacional associado aos hábitos mais saudáveis dos consumidores em geral, às características sensoriais e nutricionais dessa fruta e às novas tecnologias para sua conservação (BRAGA et al., 2013; ALBERTI et al., 2014b). Na safra 2012/13, o consumo mundial *in natura* foi de 55,15 mil toneladas (BRASIL, 2013). Em 2014, o consumo brasileiro foi de 6,10 kg/habitante, no entanto, considera-se esse índice como baixo uma vez que o consumo europeu está entre 15 a 60 kg/habitante/ano (ABPM, 2016).

No Brasil, a maior parte da produção, cerca de 70%, está voltada para o consumo doméstico, na forma *in natura* (ABPM, 2016). O restante destina-se ao processamento, principalmente, de suco e sidra, os quais geram o bagaço de maçã, principal subproduto (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

1.2 AGROINDÚSTRIA DA MAÇÃ

O primeiro passo para o beneficiamento das frutas, a colheita, ocorre quando a fruta pode ser desprendida da árvore com facilidade e apresenta pigmentos coloridos característicos. No Brasil, esse período pode variar de novembro a maio. A colheita manual garante uma boa qualidade das frutas *in natura*, porém, pomares industriais, geralmente, realizam colheita mecanizada em duas etapas. A primeira consiste em balanço da árvore com objetivo de derrubar as maçãs maduras e a segunda, de colhimento das frutas do solo. O contato com o solo pode aumentar a carga microbiana da maçã, por esse motivo, existem máquinas que realizam as duas etapas sem que o fruto atinja o solo. As maçãs são armazenadas cuidadosamente em *bins*, caixas de madeiras apropriadas, onde serão transportadas às unidades de processamento. Efetua-se o carregamento de maçã a granel apenas para as maçãs industriais (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010).

Segundo a ABPM (2016), tecnologias em nível de campo, beneficiamento e armazenamento têm sido utilizadas na produção brasileira visando à obtenção de maçãs com alta qualidade, quantidade e regularidade. Em particular, tecnologias avançadas para a conservação dessa fruta como o uso de atmosfera controlada com sistema de refrigeração com etileno glicol, o qual não agride o meio ambiente, objetivam ofertá-la com qualidade em qualquer época do ano.

As frutas destinadas ao processamento apresentam características fora do padrão para o consumo *in natura* tais como defeitos fisiológicos (escaldadura superficial, senescência, danos por deficiências minerais), morfológicos (tamanho pequeno, má distribuição de cor, formas inadequadas, marcas de cicatrizes, injúrias mecânicas) e fitossanitários (podridões, doenças pré-colheita) (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

1.2.1 Suco

Para a obtenção do suco, a maçã recepcionada na indústria pode passar pelas etapas de seleção, lavagem, sanitização, trituração, prensagem ou centrifugação, despectinização, filtração, concentração e pasteurização (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Além disso, segundo a legislação brasileira, pode haver a adição de açúcares (máximo de dez por cento em peso) e dióxido de carbono, sendo

proibida a adição de aromas e corantes artificiais. Outra etapa aceita pela legislação é a desidratação parcial ou concentração (BRASIL, 2009).

De acordo com o decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, suco é definido como:

“Bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo (Brasil, 2009)”.

O suco não deve ser confundido com néctar ou refresco. O néctar pode ser obtido pela diluição da parte comestível do fruto ou seu extrato, adicionado de açúcares, enquanto que o refresco pode ser definido como bebida não fermentada obtida pela diluição do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal da sua origem com ou sem adição de açúcar (BRASIL, 2009). O suco destinado à fermentação passa a ser denominado mosto.

1.2.2 Sidra

A legislação brasileira define sidra como:

“Bebida com graduação alcoólica de quatro a oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã fresca, sã e madura, do suco concentrado de maçã ou ambos, com ou sem a adição de água podendo ser gaseificada, desalcoolizada, adicionada de açúcares (em quantidade não superior aos açúcares da fruta), água (condicionada, exclusivamente, à padronização da graduação alcoólica do produto final) e outros aditivos (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009)”.

O processamento da sidra e/ou fermentado, basicamente, consiste na despectinização do mosto com adição de enzimas pectinolíticas, seguido de precipitação e trasfega. Na sequência, inicia-se a fermentação do mosto de forma natural, com as leveduras naturalmente presentes na maçã, ou por meio da adição de inóculo de levedura (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

Após o período de fermentação, a sidra bruta obtida é filtrada e pode, ou não, ser transferida a tanques para o período de maturação para que ocorram as fermentações secundárias. A próxima etapa consiste em adição de sacarose (75-100g/L), ácido láctico para correção de acidez, se necessário, e demais aditivos permitidos (NOGUEIRA et al., 2003a), tais como ativadores de fermentação como

sais de amônio, vitaminas, ergosterol, ácidos graxos insaturados, conservantes como ácido sórbico e dióxido de enxofre e os acidulantes, ácido cítrico e ácido láctico (BRASIL 1988; BRASIL, 1994; BRASIL, 2009). Em seguida, pode-se realizar o processo de clarificação por meio da utilização de gelatina e/ou bentonite e as últimas etapas consistem na adição de CO₂ e pasteurização (NOGUEIRA et al., 2003a).

1.2.2.1 O processo fermentativo

A fermentação para obtenção da sidra pode ocorrer em duas etapas, fermentação principal e fermentação secundária ou malolática. A fermentação principal pode ser subdividida em oxidativa, responsável pela formação dos aromas e fermentativa, transformação dos açúcares em etanol (NOGUEIRA, 2003).

A fermentação oxidativa, ocorre apenas quando há a presença de leveduras de baixa ação fermentativa, especialmente *Metschnikowia pulcherrima* e *Hanseniaspora valbyensis*, antes do inóculo da levedura comercial. Nessa fermentação ocorre o aparecimento de aroma frutado representado pelos ésteres, como acetato de etila e fenil-etila (NOGUEIRA, 2003).

A fermentação alcoólica, realizada predominantemente por leveduras do gênero *Saccharomyces*, basicamente consiste na transformação de açúcares fermentescíveis em CO₂ e etanol. Essa transformação ocorre por meio de reações oxidativas anaeróbicas, nas quais os açúcares fornecem energia (ATP, adenosina trifosfato) à levedura para que esta possa realizar as reações metabólicas necessárias para sua sobrevivência, crescimento e multiplicação. Os principais subprodutos desta fermentação, etanol e gás carbônico, são formados durante a sequência de reações oxidativas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Além das fontes de carbono, representadas principalmente pelos açúcares solúveis (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010), a atividade da levedura está associada a outros nutrientes, tais como nitrogênio disponível e oxigênio dissolvido (DRILLEAU, 1990; NOGUEIRA, 2003; ALBERTI et al., 2011). A quantidade de nitrogênio presente influencia o crescimento da levedura, alterando a taxa de fermentação e formação de aroma (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010). Ao passo que o oxigênio, utilizado na respiração celular, biossíntese de esteróis e outras oxidases, influencia a

viabilidade e vitalidade das leveduras além de afetar a produção de aromas (SALMON; FONAIRON; BARRE, 1998; ALBERTI et al., 2014a).

A fermentação secundária ou malolática ocorre no período de maturação, tendo como objetivo a melhoria do sabor da sidra, por meio da diminuição da acidez, convertendo o ácido málico em láctico por meio de bactérias ácido lácticas (RUIZ-BABA et al., 1994; DRILLEAU, 1995, NOGUEIRA, 2003).

1.2.2.2 Metabolismo fermentativo da levedura *Saccharomyces*

Os açúcares simples (frutose e glucose) são metabolizados no interior do citoplasma, penetrando por meio de difusão facilitada, a qual pode realizar o transporte de substâncias para o interior das células através da membrana com auxílio de um transportador acelerado de natureza proteica. A sacarose, no entanto, pode ser hidrolisada pela invertase no exterior da levedura. A água, dióxido de carbono e oxigênio são absorvidos e secretados por simples difusão (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

O metabolismo da glucose inicia na respiração da levedura, na qual os substratos de carbono passam pelas etapas de glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, formando gliceraldeído-3-fosfato o qual é convertido em piruvato. Na próxima etapa, em anaerobiose, o piruvato é descarboxilado em aldeído pela enzima piruvato descarboxilase e, em seguida, reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase, formando NAD^+ . No final desse processo são formadas duas moléculas de ATP, duas de etanol e duas de gás carbônico por molécula de glucose (WALKER, 1998).

As leveduras também utilizam o ciclo de Krebs para sintetizar os aminoácidos e lipídeos necessários ao crescimento. A *S. cerevisiae* obtém aminoácidos por meio da incorporação de compostos nitrogenados presentes no meio e realiza a transaminação entre aminoácidos e ácidos α -cetônicos (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

1.2.3 Bagaço

O bagaço de maçã, primariamente tratado como resíduo agroindustrial, obtido após a etapa de prensagem para a obtenção do suco (NOGUEIRA;

WOSIACKI, 2012), consiste no epicarpo e parte do mesocarpo (94,5%), sementes (4,4%) e endocarpo (1,1%) (KENEDY et al., 1999) apresentando 78-87% de água em sua composição e 13-22% de matéria seca a qual compreende, principalmente, ácidos carboxílicos, açúcares, fibras e compostos fenólicos (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

Segundo Sato et al. (2010), a estabilização do bagaço, pode ser realizada por meio da secagem a 60 °C, sendo esse, provavelmente, o método mais viável economicamente. A secagem (60 °C, por 10 horas) resulta em rendimento de aproximadamente 50,0 g/kg, ou seja, 5%. Dessa forma, além do bagaço tornar-se biologicamente estável, facilita o transporte.

Por ter amplo potencial de aplicação, o bagaço passou a ser visto como um subproduto industrial. No Brasil, esse subproduto pode ser utilizado como adubo orgânico ou como ração animal, no entanto, os açúcares fermentescíveis podem prejudicar a saúde dos ruminantes (KENEDY et al., 1999). O bagaço é uma boa fonte para produção de etanol e ácido acético (PAGANINI et al., 2005; PARMAR; RUPASINGHE, 2013), obtenção de fibras alimentares (PAGANINI et al., 2005) e compostos fenólicos (WIJNGAARD; BRUNTON, 2009; CARRANZA et al., 2016; LOHANI; MUTHUKUMARAPPAN, 2016). Além disso, esse subproduto já foi aplicado em produtos panificados (COELHO; WOSIACKI, 2010), biscoitos (PROTZEK; FREITAS; WASCZYNSKJ, 1998) e cereal extrusado (CORRAL et al., 2016).

1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

As plantas, de uma maneira geral, apresentam a capacidade de metabolizar compostos de baixo peso molecular, os quais são denominados metabólitos secundários e não fazem parte das reações de síntese principais (DE LUCA e PIERRE, 2000). Por algum tempo acreditou-se que esses metabólitos fossem os produtos finais das reações e/ou erros do metabolismo e, dessa forma, não teriam função específica. No entanto, esses compostos contribuem com as características morfológicas, principalmente a pigmentação, e fisiológicas como crescimento e reprodução dos vegetais além de fornecerem resistência a patógenos e predadores (BRAVO, 1998).

Um exemplo de compostos formados por meio das reações metabólicas secundárias dos vegetais são os compostos fenólicos (SPANOS; WROTSTAD, 1992), derivados da fenilalanina e tirosina (SHAHIDI; NACZK, 2004) e obtidos, principalmente, pelas vias do chiquimato e do acetato (BRAVO, 1998). De forma simplificada, esses compostos podem ser definidos, quimicamente, como substâncias que apresentam anel aromático com, pelo menos, um substituinte hidroxílico além de seus grupos funcionais, Figura 1.1 (ÁNGEL; GONZÁLEZ, 1999; ANGELO; JORGE, 2006).

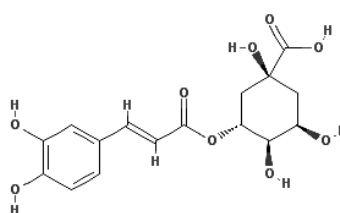


Figura 1.1 - Estrutura do Ácido clorogênico, principal composto fenólico presente em maçãs.

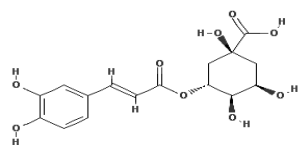
Maçãs e seus produtos contêm um alto teor de compostos fenólicos divididos em diferentes classes (KHANIZADEH et al., 2008; XU et al., 2016). O aumento do interesse pelo estudo desses compostos se deve a capacidade de atuar contra o efeito oxidativo o qual está relacionado ao envelhecimento precoce e algumas doenças cardíacas, hepáticas, neurodegenerativas, diabetes e câncer (BRAVO, 1998; BEHELIN et al., 2004; ARON; KENNEDY, 2008; SHAHIDI, 2012 e FERRETTI; TURCO; BACCHETTI, 2014, YASSIN et al., 2017).

Além de apresentar benefícios à saúde do consumidor, os fenóis desempenham considerável influência nas características sensoriais de bebidas derivadas de maçã, alterando aspectos como cor, sabores amargos e adstringentes e formação de determinados aromas (ZARDO et al., 2008). No entanto, boa parte desses compostos pode ser perdida durante o processo tecnológico (GUYOT et al., 2003; DEVIC et al., 2010). Dessa forma, a manutenção desses compostos e/ou a sua reincorporação pode trazer benefícios a esse setor produtivo.

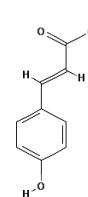
1.3.1 Composição fenólica da maçã

Os compostos fenólicos foram classificados de acordo com o número de anéis fenólicos e a estrutura dos demais elementos que fazem a ligação entre eles (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). A maior parte dos compostos fenólicos da maçã, cerca de 70%, encontra-se nos vacúolos celulares (NICOLAS et al., 1994), os quais pertencem à duas classes principais, ácidos fenólicos e flavonoides, demonstrados na Figura 1.2. Os ácidos hidroxicinâmicos representam a principal subclasse dos ácidos fenólicos e, entre os flavonóides, as principais subclasses podem ser representadas pelos flavonóis (glicosídeos de quercetina), flavan-3-óis (epicatequina, catequina e procianidinas), antocianinas e dihidrochalconas (floreína e floridzina) (TSAO et al., 2005; KHANIZADEH et al., 2008, ALBERTI et al., 2014b). O teor e a composição dos compostos presentes podem variar, principalmente, de acordo com a cultivar, estágio de maturação e disponibilidade de nutrientes (BOYER; LIU, 2004, ALBERTI et al., 2017).

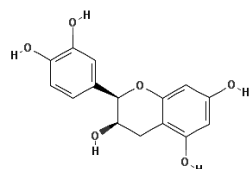
Os compostos fenólicos estão distribuídos de forma diferente na casca e polpa da maçã. No epicarpo (casca), o teor desses compostos pode ser 3 a 10 vezes maior que o encontrado no mesocarpo (polpa) (CARBONE et al., 2011). De acordo com Alberti et al. (2017), o epicarpo (casca) de maçãs maduras da cultivar Gala, por exemplo, contém epicatequina (268,6 mg/kg), procianidina B2 (222,4 mg/kg), ácido clorogênico (78,6 mg/kg), floridzina (57,3 mg/kg), catequina (29,7 mg/kg) e, em maior quantidade, glicosídeos de quercetina (341,8 mg/kg), os quais são encontrados apenas no epicarpo. No mesocarpo (polpa), em maior quantidade, encontra-se o ácido clorogênico (34,6 mg/kg) além de catequina (10,6 mg/kg) e floridzina (5,3 mg/kg). O endocarpo (centro) apresenta floridzina (98,9 mg/kg) e ácido clorogênico (78,6 mg/kg).



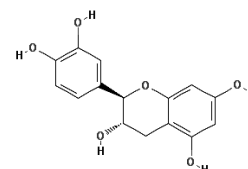
I – Ácido Clorogênico



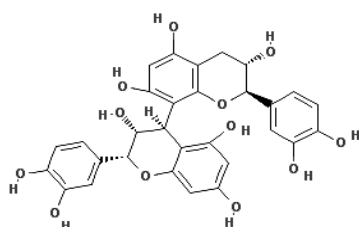
II – Ácido Cumárico



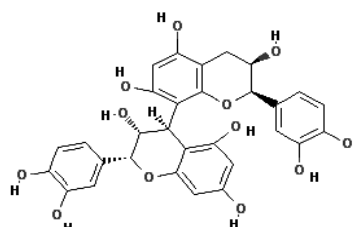
III – Epicatequina



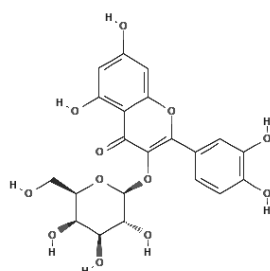
IV – Catequina



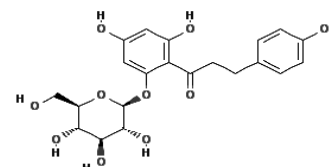
V – Procianidina B1



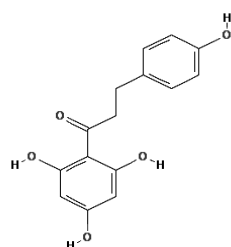
VI – Procianidina B2



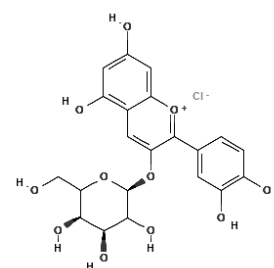
VII – Quercetina 3-galactosídeo



VIII – Flordizina



IX – Floretina



X – Cianidina 3-galactosídeo

Figura 1.2 - Estrutura dos principais compostos fenólicos presentes em maçãs. Nota: ácidos fenólicos (I e II) e flavonoides – flavan-3-óis (III, IV, V, VI), flavonóis (VIII), dihidrochalconas (VIII e X) e antocianina (X). Fonte: Pubchem (2016).

1.3.2 Efeito do processamento na composição fenólica

Durante o processamento de suco e mosto pelo método de prensagem, os compostos fenólicos são transferidos dos vacúolos para o suco, no entanto, muitos ficam retidos nas paredes celulares. Dessa forma, principalmente, os fenóis presentes no epicarpo da maçã permanecem no bagaço uma vez que esses interagem com as paredes celulares por meio de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (GUYOT et al., 2003).

Entre os compostos fenólicos presentes no bagaço de maçã, destacam-se os pertencentes às classes de flavonoides, especialmente os glicosídeos de quercetina, os quais representam a subclasse dos flavonóis, seguidos dos compostos pertencentes às subclasses dos flavanóis (procianidina e epicatequina), dihidrochalconas (floridzina) e antocianinas. Além dos flavonoides, o bagaço também apresenta os ácidos fenólicos, tendo os derivados de ácidos hidroxicinâmicos em maiores concentrações que os de hidroxibenzóicos (CAM, AABY, 2010; LU; FOO, 1997; REIS; RAI; ABU-GRANNAM, 2012). Sendo assim, os ácidos fenólicos e epicatequinas são os principais compostos transferidos para o suco (LE BOURVELLEC; GUYOT; RENARD, 2004; VAN DER SUITS et al., 2001). No entanto, a composição do bagaço pode variar de acordo com a cultivar, grau de maturação das maçãs (ALBERTI et al., 2016) e tipo de processamento realizado (ZARDO et al., 2008).

Parte dos compostos que são extraídos no suco, em presença de oxigênio molecular, oxida por meio de reações catalisadas pela enzima polifenoloxidase (PPO). Resumidamente, ocorre a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois, seguido de oxidação destes em *o*-quinonas. As *o*-quinonas condensam, dando origem a pigmentos escuros insolúveis, comumente conhecidos como melanoidinas (SOLOMON; SUNDARAM; MACHONKI, 1996; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2001). Dessa forma, o processamento de maçãs resulta em um suco/mosto com menor concentração fenólica e atividade antioxidante que o fruto intacto (DEVIC et al., 2010).

No entanto, a utilização de aditivos antioxidantes tais como dióxido de enxofre e ácido ascórbico pode diminuir as perdas de compostos fenólicos no produto final uma vez que estes podem bloquear a oxidação enzimática por meio da inibição da enzima ou interação com os compostos intermediários e/ou agentes

redutores, reconvertendo as quinonas aos compostos fenólicos originais (NOGUEIRA et al., 2003b; BILLAUD et al., 2004).

A utilização de enzimas de liquefação, além de aumentar o rendimento durante o processamento do suco ou mosto, pode proporcionar aumento na concentração de compostos fenólicos devido à incorporação, principalmente, de quercetinas e dihidrochalconas presentes na casca (WILL; BAUCKHAGE; DIETRICH, 2000; ZIELINSKI et al., 2014). Nogueira et al. (2003b) relataram que os processos de despectinização, clarificação e filtração do suco também estão relacionados com a diminuição dos teores de compostos fenólicos, eliminando cerca de 47%, 60% e 2%, respectivamente.

Segundo um estudo realizado por Nogueira et al. (2008), a composição das principais classes fenólicas do mosto após a fermentação, apresentou diminuição apenas para flavan-3-óis, provavelmente, devido a interações com as leveduras. No entanto, Zardo et al. (2008) não observaram perda de compostos fenólicos e atividade antioxidante durante a fermentação. A diminuição desses compostos foi atribuída, principalmente, às reações de escurecimento enzimático e operação de despectinização.

1.3.3 Influência dos compostos fenólicos na qualidade dos produtos

A cor, utilizada como parâmetro de qualidade de bebidas derivadas de fruta, pode ser alterada por meio de reações oxidativas dos compostos fenólicos (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). A fim de obter uma bebida mais clara, semelhante a champanha, a formação de cor pela reação de escurecimento enzimático foi eliminada durante o processamento da sidra por meio de adições de sulfito na etapa de trituração, o que preserva a quantidade de compostos fenólicos no produto e afeta diretamente a formação de aromas durante a fermentação oxidativa (CARVALHO et al., 2010).

Alguns compostos fenólicos, como os ácidos hidroxicinâmicos, podem ser precursores de compostos voláteis, contribuindo para a formação do aroma das sidras (SIMÕES, WASZCZYNSKYJ; WOSIACKI, 2009; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Os compostos fenólicos voláteis geralmente são produzidos por microrganismos presentes no produto (RODRÍGUEZ et al. 2009). Em sidra, as bactérias ácido lácticas, *Lactobacillus collinoides* e *Lactobacillus mali*, são as

principais responsáveis pela conversão de ácidos fenólicos em compostos voláteis, principalmente, etilfenóis (4-etilfenol, 4-tilcatecol e 4-etilguaiacol). A reação pode ocorrer por meio de duas vias distintas. Na primeira, o ácido fenólico é descarboxilado por ação da enzima ácido fenólico descarboxilase (RAD) e reduzido a etilfenol pela vinilfenol redutase (VPR). A outra via de conversão consiste na redução do ácido fenólico em reação catabolizada pela ácido fenólico redutase (PAR) seguida de descarboxilação por ação da hidroxifenilpropionica descaboxilase (HPR) (BURON et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Entretanto, alguns fenóis voláteis estão relacionados com perda de notas aromáticas frutadas, prejudicando a qualidade de bebidas fermentadas de frutas (BURON et al., 2011). Além disso, altas concentrações de compostos fenólicos podem gerar efeitos tecnológicos negativos relacionados à estabilidade coloidal de bebidas derivadas de frutas por serem capazes de interagir com proteínas. Em maçãs, compostos fenólicos como taninos e antocianinas realizam ligações de hidrogênio com proteínas, formando complexos insolúveis, denominados *haze* que podem ser retirados por filtração (SIEBERT; CARRASCO; LYNN, 1996; KAWAMOTO; NAKATSUBO, 1997; CARVALHO et al., 2011).

Considerando os efeitos dos polifenóis em bebidas derivadas de maçãs, a alteração do processo visando à manutenção destes poderia melhorar a qualidade do produto final. Dessa forma, a extração e reincorporação dos compostos fenólicos do bagaço pode se tornar uma alternativa de melhoria. Entretanto, a quantidade de polifenóis adicionada deve ser avaliada devido aos efeitos tecnológicos negativos que a alta concentração desses compostos pode gerar no produto final.

1.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

As reações do metabolismo celular aeróbico formam substâncias pró-oxidantes, as quais podem induzir danos oxidativos em vários alvos biológicos. Os principais compostos pró-oxidantes formados, os radicais livres, definidos como átomos ou moléculas altamente reativos por apresentarem número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, em sua maioria se apresentam como espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MAGALHÃES et al., 2008). Em condições normais, o estresse

oxidativo causa mínimos efeitos uma vez que os radicais livres podem ser eliminados ou inativados pelo sistema de defesa endógeno constituído principalmente por glutatona (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase (GSH-Px), glutatona redutase (GSH-Rd), vitamina E e ácido ascórbico (BENZIE; STRAIN, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

No entanto, quando as ERO's e ERN's são produzidas em excesso, principalmente devido a fatores externos, tais como exposição à poluição do ar, tabaco, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações, o sistema de defesa endógeno não é suficiente para impedir os efeitos oxidativos (ARON; KENNEDY, 2008). Assim sendo, essas espécies causam modificações em biomoléculas, principalmente lipídeos e proteínas do DNA, desencadeando reações que supostamente desenvolvem o envelhecimento, doenças coronárias e câncer (ARON; KENNEDY, 2008; BENZIE; STRAIN, 1996).

Os antioxidantes, compostos naturais ou sintéticos capazes de sequestrar ou impedir a formação das ERO's e ERN's (MAGALHÃES et al., 2008), podem ser obtidos por meio da dieta a fim de diminuir o estresse oxidativo (BRAVO, 1998). Estes podem ser classificados de acordo com o modo de atuação, em primários e secundários. Os primários interrompem a cadeia de oxidação doando elétrons ou hidrogênio aos radicais livres tornando-os estáveis ou formando um complexo lipídeo-antioxidante, o qual pode reagir com outro radical livre. Ao passo que os secundários retardam a iniciação da autooxidação por meio de diferentes mecanismos tais como complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos formando espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação do oxigênio singlete (ANGELO; JORGE, 2006).

Os compostos fenólicos, principais antioxidantes presentes na maçã, atuam de maneiras diferenciadas, de acordo com sua estrutura química. Dessa forma, podem interromper a cadeia de oxidação agindo como aceptores de radicais livres por meio da transferência de átomos de hidrogênio e/ou elétrons ou podem retardar a iniciação das reações, atuando como quelantes de íons metálicos, por meio transferência de elétrons (SHAHIDI; NACZK, 2004; APAK et al., 2016a).

A atividade antioxidante dos diferentes compostos fenólicos se deve ao alto potencial redox que estes apresentam além da sua estrutura molecular, principalmente, devido à posição de substituição e número de grupos hidroxílicos, pelas propriedades de outros grupos que compõe o composto e pela possibilidade

de formação de ligações de hidrogênio. Em anéis que apresentam heteroátomos de nitrogênio ou oxigênio além do grupo hidroxila substituído nas posições *para* e/ou *orto*, a atividade antioxidante aumenta devido ao efeito de ressonância entre o par de elétrons do heteroátomo e do radical fenoxil formado. Além disso, fenóis com duas ou três substituições hidroxílicas apresentam maior ação antioxidante que os compostos monohidroxilados (PANNALA et al., 2001, CHENG et al., 2002).

A efetividade da atividade antioxidante por meio da captura de radicais está relacionada, principalmente, com a presença da estrutura *o*-dihidroxi (catecol) no anel B. Além disso, ligações nos carbonos 2 e 3, principalmente a presença do grupo 3-hidroxil, conjugadas à função 4-oxo no anel heterocíclico C aumentam a efetividade do composto. A presença de grupos hidroxil ou metoxil nas posições 5 e 7, em menor grau, também podem aumentar a atividade antioxidante (PANNALA et al., 2001; PIETTA, 1999). O grupo catecol ainda está relacionado com a atuação dos compostos como quelantes metálicos, sendo o principal local onde esta reação ocorre. Os locais entre o grupo 4-oxo e 3-hidroxil no anel heterocíclico (anel C) e grupo 5-hidroxil e 4-oxo entre o anel C e A também estão relacionados com essa forma de atividade (VAN ACKER et al., 1996; PIETTA, 1999, FIRUZI et al., 2005). Contudo, o grupo dos flavonoides apresenta alta capacidade antioxidante com base em seus substituintes hidroxílicos nos anéis benzênicos. A Figura 1.3 representa a estrutura de um flavonoide, com numeração dos carbonos de acordo com a sua posição além da nomenclatura dos anéis.

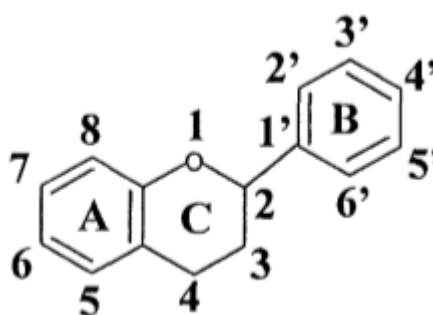


Figura 1.3 - Estrutura básica de um flavonoide. Fonte: Cook e Samman (1996).

Tsao et al. (2005) classificou a atividade antioxidante média de cinco grupos fenólicos da maçã em ordem decrescente: cianidina-3-galactosídeo > procianidinas (B1, B2) > glicosídeos de quercetina (quercetina-3-galactosídeo, quercetina-3-rhamnosídeo, quercetina-3-glucosídeo, , quercetina-3-xilosídeo) > ácido clorogênico > floridzina, pelo método de FRAP (poder de redução do ferro). Lobo et al. (2009),

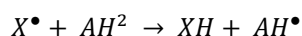
por semelhante modo, ordenaram o poder antioxidante de compostos fenólicos da sidra por meio do método de poder de redução do radical DPPH: procianidina B2 > epicatequina > catequina > quercetina (quercitrina) > ácido cafeico / ácido clorogênico. Entretanto, a ordem apresentou algumas modificações quando os compostos foram classificados de acordo com o método de FRAP: procianidina B2 > > ácido cafeico / ácido clorogênico > quercetina (quercitrina) > epicatequina / catequina.

1.4.1 Determinação da capacidade antioxidante total

Segundo Apak et al. (2016a), a 'atividade antioxidante' está relacionada com a eliminação de espécies reativas, podendo ser expressa em taxas de reação ou porcentagens eliminadas por unidade de tempo, enquanto que 'capacidade antioxidante' pode ser definida como a eficiência da conversão de espécies reativas em estáveis pelos antioxidantes, geralmente, expressa em número de mols de espécies convertidas por 1 mol de antioxidante durante um período de tempo fixo. No entanto, a maioria dos métodos não faz distinção entre 'atividade antioxidante' e 'capacidade antioxidante', portanto o termo 'capacidade antioxidante total' (TAC) vem sendo utilizado pela maioria dos pesquisadores como parâmetro para analisar amostras complexas, como alimentos e plasma sanguíneo, uma vez que indica a ação sinérgica de todos os antioxidantes presentes.

A determinação da atividade antioxidante em uma amostra está baseada reação de oxi-redução entre o oxidante e as espécies alvos (antioxidantes presentes na amostra), denominadas sondas, levando a alteração nas propriedades espectroscópicas do oxidante tais como absorbância, fluorescência e luminescência (APAK et al., 2016b). Os métodos para esta determinação podem ser classificados de acordo com a forma de atuação do antioxidante (Figura 1.4) podendo ser pela transferência do átomo de hidrogênio (TAH), como, por exemplo, os métodos de captura de radicais livres, ORAC e TRAP, ou pela transferência de elétrons não competitivos (TE), representados, principalmente, pelos métodos de CUPRAC e FRAP (redução dos íons de cobre e ferro, respectivamente). Em alguns métodos, como o de captura do radical DPPH e descoloração do radical ABTS, podem ocorrer as duas formas de atuação (TAH/TE) (BARTOSZ, 2010; APAK et al., 2016a e b).

Reações TAH



Reações ET

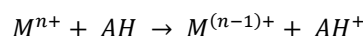
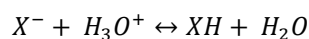
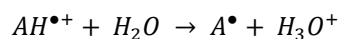
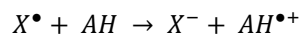


Figura 1.4 - Esquema das reações ocorridas pelas diferentes formas de atuação de antioxidantes.
Nota - X[•]: radical livre, AH: antioxidante, M: metal. Fonte - Bartosz (2010).

O fato dos antioxidantes exercerem seu efeito por meio de diversos mecanismos além de alguns deles poderem agir em sinergismo levou ao desenvolvimento de uma grande variedade de testes e grande divergência de resultados. Portanto, os métodos para determinação da atividade antioxidante devem ser escolhidos de acordo com o efeito avaliado (NIKI; NOGUCHI, 2000), sendo que a determinação por apenas um método não é confiável (APAK et al., 2016a).

1.5 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DA MAÇÃ

A obtenção de compostos fenólicos a partir do bagaço da maçã vem sendo alvo de pesquisas. O primeiro trabalho encontrado com tal objetivo, publicado em 2003, reporta a recuperação combinada de compostos fenólicos e pectina deste subproduto. Os autores utilizaram resina Amberlite XAD 16 HP a fim de remover os compostos fenólicos por meio da adsorção, a qual se mostrou mais eficiente em banho de água a 60 °C. Após o período de adsorção, os compostos fenólicos foram eluídos em metanol, evaporados a vácuo e liofilizados. O composto fenólico obtido em maior quantidade foram a floridzina (40,4 mg/g), seguido de ácido clorogênico (14,3 mg/g), quercetina-3-galactosídeo (11,4 mg/g), epicatequina e procianidina B2 (9,3 mg/g), floretina xiloglucosídeo (8 mg/g) e quercetina (6,5 mg/g), além de outros em menores quantidades (SCHIEBER et al., 2003).

Estudos apontam que o método de maceração vem sendo muito utilizado para obtenção dos compostos fenólicos do bagaço de maçã. Carranza et al. (2016) realizaram extração com água variando a temperatura (20, 40 e 60 °C) e tempo (0,5,

1, 3, 6 e 12 horas) mantendo agitação constante. Os autores quantificaram os teores de vitamina C, flavonoides totais e compostos fenólicos totais e concluíram que as melhores extrações foram realizadas em maiores temperaturas por curtos períodos de tempo.

Reis, Rai e Abu-Gnhannam (2012) realizaram a extração do bagaço em três etapas. Na primeira, foi utilizado apenas água como solvente, à temperatura ambiente e tempo variando de 10 a 40 minutos. O resíduo desta extração foi reconstituído com solução aquosa de metanol, em concentrações de 20 a 100%, mantendo as mesmas condições. Por fim, o resíduo da segunda extração foi reconstituído com acetona (20-100%), procedendo da mesma maneira. Os principais compostos obtidos apenas com água como solvente foram o ácido clorogênico (7,28 µg/mL), procianidina dímero B (6,99 µg/mL) e epicatequina (5,39 µg/mL). O metanol utilizado como solvente foi eficiente na extração de rutina (8,92 µg/mL), além de ácido clorogênico (5,32 µg/mL) e quercetina (3,96 µg/mL), enquanto que a acetona se mostrou eficiente sob os flavanóis, extraindo, principalmente, procianidina dímero B (5,6 µg/mL), epicatequina (4,3 µg/mL) e procianidina trímero C (3,15 µg/mL).

Outros trabalhos mostram que metanol e acetona, têm sido muito utilizados (LOHANI e MUTHUKUMARAPPAN, 2016; RAZAEI et al., 2013; SUÁRES et al., 2010), no entanto, esses apresentam toxicidade e não são totalmente eliminados durante a etapa de eliminação do solvente, geralmente realizada por evaporação. Portanto, se o objetivo da extração fenólica for a sua aplicação em produtos alimentícios ou farmacêuticos, solventes como metanol e acetona não são recomendados.

Soares et al. (2008), realizaram extração utilizando 3 g de bagaço seco em soluções aquosas de metanol, etanol e acetona nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100% (v/v). Os resultados mostraram a acetona na concentração de 75% apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais. O extrato com etanol apresentou maiores rendimentos que o metanol nas concentrações de 25 e 50%. Segundo Wijngaard e Brunton (2010), o etanol pode ser utilizado em processos de extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã e, comparado à acetona, não há diferenças significativas. No entanto, o gasto energético pode ser maior, uma vez que a temperatura ótima de extração para acetona foi 25 °C enquanto para o etanol, 80 °C, além disso, como o ponto de ebulição da acetona é menor, a energia utilizada para removê-la do extrato fenólico também seria menor.

Recentemente, novas tecnologias têm sido utilizadas com o objetivo de aumentar a quantidade e qualidade dos compostos extraídos com etanol, bem como, diminuir o tempo e energia de processo, tais como líquido pressurizado (WIJNGAARD; BRUNTON, 2009), micro-ondas (BAI; ZHANG; REN, 2013; CHANDRASEKAR et al., 2015) e ultrassom (BAI et al., 2010; VIROT et al., 2010; GRIGORAS et al., 2013).

1.5.1 Cinética da extração

O estudo cinético, uma ferramenta da engenharia, vem sendo utilizado a fim de facilitar a otimização, simulação, planejamento e controle de processos, por meio do ajuste dos resultados a um modelo matemático. A modelagem pode também contribuir para melhor utilização da energia, tempo e solvente (AMENDOLA; DE FAVERI; SPIGNO, 2010).

Muitas equações vêm sendo propostas a fim de modelar compostos extraídos de plantas, permitindo a obtenção de informações sobre o processo como a concentração máxima, denominada concentração de equilíbrio e a constante da transferência de massa, a qual pode ser utilizada para calcular a energia de ativação, sendo esta a energia requerida para que o composto de interesse seja transferido para o solvente (SANT'ANNA et al., 2012; SANT'ANNA; MARCZAK; TESSARO, 2013). Amendola; De Faveri e Spigno (2010) verificaram que a equação cinética de primeira ordem aparente representou bem o processo de extração de compostos fenólicos da semente de uva.

1.5.2 Otimização da extração

A eficiência da extração sólido/líquido depende do solvente utilizado, relacionado, principalmente, à sua polaridade, densidade, viscosidade e ligação de hidrogênio (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006; KAJDZĀNOSKA; PETRESKA; STEFOVA, 2011). Os solventes orgânicos adicionados de água tem mostrado boa eficiência durante a extração desses compostos uma vez a adição de água pode aumentar a taxa da extração uma vez que a solubilidade dos diferentes compostos pode ser melhorada por meio da mistura de solventes (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007). Além do tipo de solvente utilizado, outros

parâmetros como tempo, temperatura, razão sólido/líquido, agitação, entre outros têm sido estudados e otimizados em processos de extração (WIJNGAARD; BRUNTON, 2009; WIJNGAARD; BRUNTON, 2010; ALBERTI et al., 2014b).

A quimiometria vem sendo utilizada para a otimização de processos analíticos devido a necessidade de obter resultados com número reduzido de experimentos, a fim de diminuir o consumo de reagentes, tempo e custo de processo. Modelos matemáticos permitem a verificação da relevância estatística dos fatores avaliados, a importância dos seus efeitos, bem como, a interação entre os eles. O primeiro passo para a otimização multivariada em ensaios complexos de extração é a combinação dos fatores, por meio de um planejamento fatorial completo ou fracionado (FERREIRA et al., 2007; CALLAO, 2014). O planejamento fatorial fracionado de três níveis fornecendo 15 experimentos proposto por Box-Behnken (1960) vem sendo amplamente utilizado em processos de extração (FERREIRA et al., 2007; ALBERTI et al., 2014b; ZIELINSKI; HAMINIUK; BETA, 2016).

O método de superfície de resposta (RSM) acoplado à múltipla regressão linear, utilizado para otimização de processos, avalia os parâmetros e suas interações obtendo um modelo matemático, o qual define as relações entre as respostas (concentrações dos compostos extraídos) e os fatores independentes (BAS; BOYACI, 2007; BEZERRA et al., 2008; FARRIS; PIERGIOVANNI, 2009, ZIELINSKI; HAMINIUK; BETA, 2016).

1.6 ESTABILIDADE DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A estabilidade de uma matéria-prima ou de um composto de interesse pode ser entendida como o tempo pelo qual as características apresentadas na data de fabricação são mantidas (BILIA et al., 2001; SILVA et al., 2009).

Silva et al. (2010) avaliaram a estabilidade da antocianina obtida da casca de jabuticaba em solução de etanol (70%) adicionada de carboidratos (maltodextrina, maltodextrina/ goma arábica e goma arábica) por meio da verificação da degradação dos pigmentos e compostos bioativos. As amostras foram armazenadas por 21 dias em placa de petri sob incidência de luz fluorescente à temperatura de 25 °C ou protegida da incidência de luz a 10 °C. Foi possível verificar que a maltodextrina propiciou maior retenção de antocianinas durante o armazenamento e que tanto as

antocianinas quanto os compostos responsáveis pela atividade antioxidante são sensíveis à luz e ao calor.

Nishiyama et al. (2010) determinaram a estabilidade de chás avaliando o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante imediatamente após o preparo e após 24 horas de estocagem à 25 e 8 °C. Os principais compostos fenólicos determinados foram cafeína, catequina, epicatequina e epigallocatequina galato os quais, após o período de armazenamento, não apresentaram alterações aparentes nem perda de atividade antioxidante nas temperaturas avaliadas.

Contudo, fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, presença de oxigênio bem como as propriedades físico-químicas do produto, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, entre outros, podem influenciar o tempo de estabilidade de compostos bioativos (SILVA et al., 2009; NISHIYAMA et al., 2010; SILVA et al., 2010; YATSU; BORGHETTI; BASSANI, 2011). Dessa forma, a estabilidade dos extratos fenólicos deve ser avaliada a fim de garantir que o produto reincorporado com esses compostos apresente as características funcionais e sensoriais desejadas durante todo período de armazenamento.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E ESTUDO CINÉTICO DA EXTRAÇÃO E ESTABILIDADE DO EXTRATO FENÓLICO DO BAGAÇO DA MAÇÃ UTILIZANDO ETANOL COMO SOLVENTE

RESUMO

O bagaço da maçã, subproduto gerado durante o processamento da fruta, retém boa parte da composição fenólica da maçã intacta. Os polifenóis, compostos bioativos presentes em maçãs e seus produtos, além de conferirem benefícios à saúde do consumidor, podem influenciar positivamente a qualidade sensorial dos produtos derivados dessa fruta. Portanto, o presente capítulo teve como objetivo a otimização e estudo cinético do processo de extração dos compostos fenólicos do bagaço da maçã utilizando uma solução hidroalcoólica como solvente. Além disso, a estabilidade do extrato obtido foi avaliada. O experimento visando à otimização foi realizado por meio de um planejamento fatorial Box-Behnken. As variáveis avaliadas foram concentração de solvente (40, 60 e 80% v/v), temperatura (20, 35, 50 °C) e razão sólido/líquido (1:10, 1:20 e 1:30, m/v). O tempo de extração foi padronizado em 20 minutos. O rendimento foi verificado com base na concentração de flavonoides totais, principal classe presente no bagaço da maçã. Além disso, foi determinada a capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS. Através da análise de regressão linear múltipla acoplada ao método de superfície de resposta (MSR) foi possível definir as condições ótimas para o processo de extração, sugerindo que seja realizado utilizando etanol 60%, a 50 °C, na razão sólido/líquido de 1:20 (m/v). O modelo foi validado externamente, uma vez que o valor predito se aproximou do observado em um intervalo de 95% de confiança. Por meio de um modelo cinético de primeira ordem foi possível definir a concentração de equilíbrio da extração para cada temperatura, sendo 1852,77; 1728,35 e 1265,29 mg CAT/kg para as temperaturas de 50, 35 e 20 °C, respectivamente. O tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido foi o mesmo independente da temperatura. A partir desses resultados, a energia de ativação necessária para que ocorra a transferência do soluto foi 9,01 kJ/mol. A estabilidade do extrato obtido foi avaliada com base no conteúdo de flavonoides totais pelo período de 90 dias em diferentes condições de temperatura e pH do meio. Em geral, os flavonoides apresentaram boa estabilidade e a condição sugerida para armazenamento ou aplicação desse extrato foi a 10 °C em pH de aproximadamente 3,5.

Palavras-chave: Método de superfície de resposta (MSR); Box-Behnken, regressão linear múltipla; estabilidade.

2.1 INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkh) apresenta alto teor de compostos fenólicos de diferentes classes, podendo ser considerada boa fonte de antioxidantes (KHANIZADEH et al., 2008; XU et al., 2016). Esses compostos podem aumentar a vida de prateleira dos alimentos bem como conferir benefícios à saúde do consumidor devido à capacidade de atuar contra o efeito oxidativo, podendo diminuir ou retardar os efeitos das reações que levam ao envelhecimento e algumas doenças cardíacas, neurodegenerativas, diabetes e câncer (SHAHIDI, 2012; FERRETTI; TURCO; BACCHETTI, 2014; COSTA et al., 2017). Além disso, podem estar relacionados com aspectos essenciais para a determinação da qualidade de bebidas derivadas da maçã (CARVALHO et al., 2010). Entretanto, durante o processamento, boa parte desses compostos fica retida no bagaço ou passa por reações de oxidação enzimática, diminuindo sua concentração no produto final (GUYOT et al., 2003; DEVIC et al., 2010).

O bagaço, subproduto da agroindústria da maçã (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012), retém cerca de 50% dos compostos fenólicos da fruta intacta (VAN DER SLUIS et al., 2002). De acordo com Waldbauer, McKinnon, e Kopp (2017), o bagaço representa mais de 25% do total de maçã processada, sendo gerado cerca de 8,9 milhões de toneladas, uma vez que, dependendo da região, estima-se que até 40% da maçã produzida destina-se ao processamento e, no ano de 2016, a produção mundial atingiu cerca de 89 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2017). A maior parte dos compostos fenólicos retidos no bagaço de maçã pertence à classe de flavonoides, a qual abrange 85% do conteúdo fenólico total (CAM, AABY, 2010; REIS; RAI; ABU-GRANNAM, 2012). Por esse motivo, alternativas que visam à manutenção ou reincorporação desses compostos podem trazer melhorias na qualidade nutricional e sensorial dos produtos da maçã.

A recuperação dos compostos fenólicos retidos no bagaço pode ser efetuada por meio de ensaios de extração. A extração por meio de solventes orgânicos aquosos fornece bons rendimentos (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007). Fatores como natureza e concentração do solvente, tempo, temperatura, razão sólido/líquido, agitação, entre outros vêm sendo utilizados como parâmetros em ensaios de extração (LOHANI e MUTHUKUMARAPPAN, 2016; RAZAEI et al.,

2013; REIS, RAI E ABU-GHANNAM, 2012; WIJNGAARD; BRUNTON, 2010; ALBERTI et al., 2014). Portanto, a otimização da extração desses compostos se faz necessária a fim de conhecer as melhores condições para obter o maior rendimento possível em menor tempo e custo de processo.

Recentemente, métodos de extração que minimizem o uso de materiais perigosos para a saúde humana e ao ambiente, diminuam a energia e quantidade de água e ainda, busquem a máxima eficiência do processo vêm sendo alvo de interesse (CHEMAT et al. 2015). Novas tecnologias como a extração assistida com líquido pressurizado (ELP) (WIJNGAARD; BRUNTON, 2009), assistida por micro-ondas (EAM) (BAI et al. 2010; BAI; ZHANG; REN, 2013; CHANDRASEKAR et al., 2015) e assistida por ultrassom (EAU) vêm sendo utilizadas a fim de atingir tais objetivos em extratos de bagaço de maçã (VIROT et al., 2010). De acordo com Grigoras et al. (2013), a tecnologia EAM fornece melhor rendimento, no entanto, o perfil fenólico apresentou semelhança entre a extração realizada por meio da maceração utilizando etanol e as tecnologias ELP e EAU.

Dessa forma, considerando o investimento necessário, a extração sólido/líquido utilizando etanol como solvente em condições otimizadas por meio do método de superfície de resposta (MSR) acoplado à múltipla regressão linear, os quais avaliam a importância dos fatores, suas interações e relevância estatística (BAS; BOYACI, 2007; ZIELINSKI; HAMINIUK; BETA, 2016), pode ser uma alternativa de extração economicamente vantajosa.

Portanto, o presente capítulo visa à otimização da extração de compostos fenólicos retidos no bagaço da maçã utilizando etanol e água como solventes, a fim de obter um extrato que possa ser utilizado em produtos alimentícios, com objetivo de melhorar a qualidade nutricional e sensorial. Além disso, o trabalho visa avaliar a extração por meio de um modelo cinético e verificar a estabilidade dos compostos obtidos.

2.2 MATERIAS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Foram utilizadas maçãs da cultivar Fuji adquiridas no comércio local, município de Ponta Grossa (25 ° 05 ' 42 " S 50 ° 09 ' 43" O), Paraná, Brasil. Os reagentes utilizados Trolox (6 -hidroxi - 2,5,7,8 - tetrametilcromano - 2-ácido carboxílico), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) e DPPH (2,2- difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-ácido sulfônico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) . Etanol 99,5% (ANIDROL, São Paulo, Brasil) foi utilizado como solvente no processo de extração. Como padrões para o perfil fenólico foram utilizados ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, floridzina, quercetina-3-*D*-galactosídeo (hiperosídeo), quercetina-3- β -*D*-glucosídeo (isoquercetina), quercetina-3-*O*-ramnosídeo (quercitrina), quercetina-3-rutinosídeo (rutina) e quercetina-*O*- α -*L*-arabinofuranosídeo (avicularina), adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). As soluções aquosas foram preparadas com água ultra-pura (Milli-Q, Millipore, Brasil).

O sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizado, Waters Alliance 2695 (Milford, MA, EUA), possui uma bomba quaternária, degaseificador e injetor automático. O detector utilizado foi o de arranjo de fotodiodos Waters PDA 2998 (Milford, MA, EUA) e a coluna de separação (Waters, Milford, MA, EUA) foi a Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m).

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Obtenção do bagaço

O bagaço foi obtido a partir da elaboração de suco de maçã por meio do método de prensagem, de acordo com Alberti et al. (2016). Primeiramente, as maçãs obtidas passaram pela etapa de seleção, sendo eliminadas as frutas inadequadas, principalmente, por apresentarem podridões. Em seguida, foram lavadas em água corrente e sanitizadas em solução de cloro a 200 mg/L por 10 minutos a 4 °C (GOMES et al., 2014). A remoção do cloro foi efetuada em seguida, utilizando água corrente. As frutas devidamente higienizadas foram trituradas em um

multiprocessador (Metvisa MPA, Brusque, SC, Brasil), acondicionadas em telas plásticas e prensadas (Hoppe Ind. Ltda, Gravataí, SP, Brasil) à pressão de 3,0 kgf/cm² durante 5 minutos, obtendo o suco e o subproduto de interesse, o bagaço.

O volume de bagaço gerado representou aproximadamente 42% do total de maçã processada, o qual foi desidratado em estufa a 50 °C (MARCONI MA-03), triturado em moinho de facas (IKA WERKE, M20, USA) e padronizado por meio de tamisação entre 20 e 40 mesh, obtendo partículas com diâmetros de 0,42 a 0,84 mm.

2.2.2.2 Extração dos compostos fenólicos

Foram realizados ensaios de extração utilizando 2 g de bagaço desidratado (2,42% de umidade), variando a concentração de solvente (40, 60 e 80%), temperatura (20, 35 e 50 °C) e razão sólido/líquido (1:10, 1:20 e 1:30 m/v) segundo um planejamento fatorial proposto por Box e Behnken (1960) com quinze experimentos (Tabela 2.1). Soluções aquosas de etanol foram utilizadas como solvente, as quais são permitidas para finalidades alimentícias. Após o período de extração, o bagaço foi imediatamente retirado e o extrato foi centrifugado (HITACHI KOKI Co. Ltda., CR21GII, Japão) a 8500 x g a 4 °C por 20 minutos para completa remoção das partículas. O sobrenadante coletado foi rotaevaporado (TECNAL, TE-211, SP, Brasil) a 50 °C por 20 minutos a fim de remover o solvente, seguido de ajuste do volume final em todas as amostras. O extrato obtido foi armazenado para ser utilizado nas análises químicas e instrumentais. Para quantificação dos compostos fenólicos individuais, a amostra foi congelada à -86 °C (NUAIRE, NU-9668GC, MN, USA), liofilizada (TERRONI, LS3000, SP, Brasil) e reconstituída em solução de ácido acético e metanol 2,5% na proporção de 3:1 (v/v). O extrato reconstituído foi filtrado em filtro seringa (Waters, Milford, MA, USA) com porosidade de 0,22 µm (Nylon).

Tabela 2.1 - Planejamento fatorial Box-Behnken aplicado para a extração dos compostos fenólicos do bagaço da maçã.

Experimentos	Fatores		
	Concentração de solvente (%)	Temperatura (° C)	Razão soluto: solvente (m/V)
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	-1
10	0	+1	-1
11	0	-1	+1
12	0	+1	+1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
Valores reais*			
-1	40	20	1:10
0	60	35	1:20
+1	80	50	1:30

Nota: *: valores adotados para cada fator nos experimentos de extração fenólica.

2.2.2.3 Caracterização dos extratos

Flavonoides totais:

A concentração de flavonoides totais dos quinze experimentos foi determinada de acordo com o método descrito por Zhishen, Mengheng e Jianming (1999) com pequenas adaptações. Em tubos de ensaio foram adicionados 250 µL de amostra de extrato, 2 mL de água deionizada e 120 µL de nitrito de sódio (NaNO₂) 0,5 mol/L. Os tubos foram agitados em vórtex (Vortex Mixer KMC – 13000V, Vision Scientific, Yuseong-Gu, Daejeon-Si, Coréia) e permaneceram em repouso em ausência de luz durante cinco minutos. Após esse período, foi adicionado 120 µL de cloreto de alumínio (AlCl₃.6H₂O) 10%, os tubos foram novamente agitados e mantidos em repouso por cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 800 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L. Foram transferidos 300 µL do conteúdo dos tubos para microplacas de 96 poços de fundo chato onde foram realizadas as

leituras das absorvâncias a 510 nm em leitor de microplacas (Epoch microplate spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA). As absorvâncias dos extratos foram comparadas com uma curva de calibração de catequina (FT = 568,18X absorvância; $R^2 = 0,998$). Os resultados foram expressos em miligrama de catequina equivalente por quilograma de bagaço seco (mg CAT/Kg).

Atividade antioxidante *in vitro*:

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos métodos de FRAP, poder antioxidante de redução do ferro, descrita por Benzie e Strain (1996); pelo método da captura do radical livre DPPH, de acordo com Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995) e pelo método de descoloração do cátion ABTS (RE et al., 1999), adaptados para o leitor de microplacas. Para o método de FRAP, uma alíquota de 10 μ L de amostra foi colocada em microplaca de 96 poços seguido de 290 μ L do reagente FRAP previamente preparado. A mistura foi agitada e, depois de transcorrido o tempo de trinta minutos no escuro, a leitura foi efetuada a 593 nm. No método de DPPH, foi utilizado 50 μ L de amostra acrescido de 250 μ L do radical DPPH (125 μ mol/L), realizando a leitura a 517 nm após o período de trinta minutos em ausência de luz. Por fim, para o método de ABTS, 20 μ L de amostra acrescida de 280 μ L do reagente ABTS, anteriormente preparado, permaneceram em repouso no escuro durante trinta minutos. Em seguida, a leitura foi efetuada a 734 nm. As absorvâncias obtidas nos três métodos realizados foram comparadas com uma curva de calibração de trolox (FRAP = 1111,11 x absorvância; $R^2 = 0,991$; DPPH = 3,57 x absorvância; $R^2 = 0,996$ e ABTS = 5,29 x absorvância $R^2 = 0,997$) e os resultados foram expressos em miligrama de trolox equivalente por quilograma de bagaço (mg TE/Kg).

2.2.2.4 Otimização da extração

As condições da extração foram otimizadas utilizando o método de superfície de resposta (RSM) juntamente com análise de regressão linear múltipla por meio de uma equação polinomial de segunda ordem, demonstrada na equação (1), onde y é a resposta predita, β_0 , β_i , β_{ij} e β_{ij} coeficientes de regressão intercepto,

linear, quadrático e interação de termos e x_i e x_{ij} , as variáveis independentes (BRUNS; SCARMINO; BARROS NETO, 2006).

$$y = \beta_0 - \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_{ii} + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_{ij} \quad (1)$$

As variáveis independentes avaliadas foram denominadas x_1 : concentração de solvente, x_2 : temperatura e x_3 : razão sólido/líquido. A significância estatística das variáveis avaliadas na equação de regressão foi verificada por meio do teste ANOVA, sendo que as variáveis não-significativas foram excluídas e o modelo foi reajustado apenas com as significativas ($p \leq 0,05$). A condição ótima simultânea para as variáveis avaliadas foi determinada por meio da função desejável proposta por Derringer e Suich (1980). A adequação e a qualidade de ajuste dos modelos foram avaliadas por meio do p-valor (falta de ajuste), coeficiente de determinação (R^2) e seu R^2 ajustado. A validade do modelo foi verificada por meio da repetição da extração utilizando as condições ótimas. Os valores experimentais de cada variável resposta foram determinados e comparados com as respostas previstas visando avaliar o poder de predição do modelo utilizado.

2.2.2.5 Compostos fenólicos individuais

O extrato fenólico obtido em condições otimizadas foi analisado quanto à composição fenólica individual por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo Alberti et al. (2014), nas seguintes condições: sistema de eluição binária seguindo o seguinte gradiente: 3-9% B (0-5 min.), 9-16% B (5-15 min.), 16-36,4% B (15-33 min.), seguido de limpeza (100% B por 5 min.) e acondicionamento da coluna (3% B por 10 min.), sendo o solvente A, solução de ácido acético 2,5% e o solvente B, acetonitrila. A taxa de fluxo utilizada foi de 1 mL/min.; volume de injeção: 10 μ L; temperatura da coluna: 20 °C e faixa de detecção: espectro de 200 a 400 nm. A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas por meio da comparação dos tempos de retenção e espectro das amostras com curvas de calibração previamente preparadas com padrões (Tabela 2.2). As corridas foram monitoradas a 280 nm (flavan-3-óis e dihidrochalconas), 320 nm (ácidos hidroxicinâmicos) e 350 nm (flavonóis).

Tabela 2.2 - Parâmetros cromatográficos dos padrões fenólicos utilizados.

Composto fenólico	TR (min.)	Banda UV (nm)	Regressão linear	R ²	LOD*	LOQ*
Ácido Clorogênico	9,21	326,2	y=25239x-13321	0,997	0,59	1,80
Ácido Cumárico	15,52	310,7	y=61187x-85345	0,998	0,52	1,59
Ácido Cafeico	10,92	323,8	y=39960x+80223	0,984	0,07	0,20
Floridzina	24,50	285,8	y=17194x-30986	0,997	1,28	3,86
Rutina	18,73	354,9	y=14303x-72994	0,998	0,50	1,52
Hiperosídeo	18,99	354,9	y=14225x-2367,6	0,999	0,29	0,89
Isoquercetina	19,55	354,9	y=22090x-59247	0,998	0,03	0,08
Avicularina	21,16	353,7	y=19875x-29203	0,998	0,29	0,89
Quercitrina	21,90	348,9	y=20504x-34187	0,989	0,15	0,46

Nota: TR: tempo de retenção; LOQ: limite de quantificação; LOD: limite de detecção, *: µg/mL.

2.2.2.6 Estudo cinético

A cinética do processo de extração foi estudada após a otimização das condições do processo. A extração foi repetida utilizando os pontos ótimos referentes à concentração do solvente (etanol 60%) e razão sólido/líquido (1:20 m/V), nas temperaturas de 20, 35 e 50 °C. As amostras foram coletadas sob o tempo após o período de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 minutos. O rendimento da extração foi determinado em cada ponto coletado por meio da quantificação do teor de flavonoides totais, uma vez que esta representa a principal classe de compostos fenólicos presentes no bagaço da maçã. Os dados obtidos foram ajustados em um modelo cinético não linear de primeira ordem (Equação 2) descrito por Weibull e Sueden (1951).

$$C_t = C_{eq}^* (1 - e^{(-kt)}) \quad (2)$$

Onde k é o coeficiente de transferência de massa global (min.⁻¹), C_{eq} é a concentração de equilíbrio do soluto na interface sólido-líquido (mg do soluto/kg do material) e C_t é a concentração de soluto no tempo t (mg do soluto/kg do material).

A variação da constante de transferência de massa (k) em função da temperatura foi ajustada na equação de Arrhenius (Equação 3) e a energia de ativação da reação foi calculada.

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

Sendo $\ln k_0$: frequência de colisão, E_a : energia de ativação (kJ/ mol), R: constante dos gases (8,3145 J/mol.K) e T: temperatura (K).

2.2.2.7 Estabilidade

O extrato obtido em condições ótimas foi armazenado durante o período de 90 dias em diferentes temperaturas (10, 20, 35, 62 °C) e pH's (3,5, 4,5, 5,5 e 6,5), corrigidos como proposto por Li et al. (2012) mediante a adição de NaOH 1 mol/L e HCl 2 mol/L, sendo que o pH natural do extrato estava em 5,3. A concentração de flavonoides totais foi determinado em alíquotas coletadas sob o tempo de armazenamento.

2.2.2.8 Análise estatística

Os dados experimentais foram apresentados como média e desvio padrão. A homogeneidade das variâncias de cada variável foi verificada pelo teste de Levene ($p \geq 0,05$). As diferenças entre as amostras foram avaliadas por meio do teste t-Student ou pela análise de variância (ANOVA, fator único), seguido de teste de médias de Fischer. A significância estatística dos modelos cinéticos de extração foi examinada pela análise de ANOVA e a qualidade e adequação dos ajustes, pelo coeficiente de determinação (R^2) e seu R^2 ajustado e a raiz do erro médio quadrático (RMSE). As análises estatísticas e os estudos cinéticos foram realizados no software STATISTICA v. 13.2 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Caracterização dos extratos

Os resultados apresentaram diferença significativa entre os experimentos ($p < 0,05$), indicando que as variáveis utilizadas (concentração de solvente, temperatura e razão sólido líquido) influenciaram no rendimento da extração (Tabela 2.3). O experimento número 4 apresentou os melhores resultados, o qual foi realizado com etanol 80%, na razão 1:20, mantido a 50 °C. Em contrapartida, o experimento 8 (etanol 80%, razão 1:30 à 35 °C), em geral, apresentou os menores resultados.

Tabela 2.3 - Concentração de flavonoides totais e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS nos quinze experimentos de extração.

	Flavonoides (mg CAT/Kg)	DPPH ($\mu\text{mol TE/Kg}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE/Kg}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE/Kg}$)
1	905,46 ^e \pm 47,79	11791,98 ^d \pm 94,93	8340,74 ^f \pm 325,52	12232,19 ^e \pm 702,77
2	622,55 ^g \pm 27,44	6747,21 ^e \pm 137,90	4637,04 ^{gh} \pm 115,65	8825,96 ^g \pm 483,64
3	1485,1 ^b \pm 49,2	13693,82 ^a \pm 282,18	10744,44 ^c \pm 588,73	15759,53 ^b \pm 630,13
4	1715,91 ^a \pm 10,65	13418,02 ^a \pm 34,47	14970,37 ^a \pm 707,73	17296,11 ^a \pm 428,69
5	631,63 ^g \pm 17,52	6149,66 ⁱ \pm 156,41	2785,2 ^j \pm 128,3	7501,32 ^h \pm 421,95
6	1017,52 ^d \pm 20,17	6787,43 ⁱ \pm 114,77	4914,8 ^g \pm 262,54	9806,20 ^f \pm 306,69
7	805 ^f \pm 41	7528,63 ^h \pm 162,92	4025,92 ^{hi} \pm 378,16	9686,35 ^f \pm 308,24
8	536,93 ^h \pm 22,18	5483,15 ^k \pm 210,64	2544,44 ^j \pm 200,31	6405,31 ⁱ \pm 1763,32
9	855,3 ^{ef} \pm 21,7	8051,50 ^g \pm 26,33	3655,55 ⁱ \pm 111,11	8626,64 ^g \pm 174,81
10	1657,12 ^a \pm 79,42	12176,94 ^c \pm 120,66	12100,00 ^b \pm 192,45	15835,22 ^{cd} \pm 464,61
11	1215,2 ^c \pm 12,8	9867,15 ^f \pm 124,29	7785,18 ^f \pm 178,59	11831,01 ^e \pm 177,52
12	1698,15 ^a \pm 34,97	12763,0 ^b \pm 209,7	9405,55 ^e \pm 386,23	15413,86 ^{cd} \pm 257,62
13	1253,08 ^c \pm 50,39	11464,5 ⁱ \pm 71,7	8419,4 ^f \pm 228,5	15530,55 ^{cd} \pm 221,49
14	1447,21 ^b \pm 48,47	11510,44 ^{de} \pm 235,29	9877,78 ^{de} \pm 96,22	16153,13 ^{bc} \pm 520,58
15	1491,00 ^b \pm 30,62	12659,59 ^b \pm 356,19	10507,4 ^{cd} \pm 1291,39	15161,54 ^d \pm 684,39

Nota: ^{abc} – letras diferentes entre as colunas indica diferença significativa entre os experimentos ($p < 0,05$).

A concentração de flavonoides totais variou de 536 a 1715 mg CAT/kg. O resultado está de acordo com Cetkovic et al. (2008), os quais apresentaram concentrações de flavonoides entre 450 a 1190 mg/kg, expresso em equivalentes de rutina, em extratos realizados em um processo assistido com ultrassom em bagaços de seis cultivares de maçãs. Tais resultados indicam que a extração com etanol em condições ideais pode resultar em um bom rendimento.

A atividade antioxidante pelo método de DPPH apresentou concentrações variando de 5483 a 13693 $\mu\text{mol TE/kg}$, pelo método de ABTS, 6405 e 17296 $\mu\text{mol TE/kg}$ e pelo método de FRAP entre 2544 e 14970 $\mu\text{mol TE/kg}$. Wijngaard e Brunton (2010) realizaram vinte ensaios de extrações do bagaço de maçã utilizando etanol e água e encontraram capacidade antioxidante semelhante ao presente estudo pelo método de DPPH, com teores variando de 7750 a 17259 $\mu\text{mol TE/kg}$. No entanto, os resultados determinados pelos métodos de ABTS e FRAP estão abaixo do encontrado por Soares et al. (2008), os quais determinaram a atividade antioxidante em bagaço de maçã Gala, obtendo concentrações de 25460 $\mu\text{mol/kg}$ e 39150 $\mu\text{mol/kg}$ nos métodos de ABTS e FRAP, respectivamente. Possivelmente, a maior atividade antioxidante encontrada por esses autores em comparação ao presente estudo se deve a diferença entre os solventes uma vez que estes utilizaram acetona 75%. De acordo com Kajdzanoska, Petreska, Stefova (2011), o solvente utilizado influencia o tipo de compostos extraídos, principalmente, devido a sua polaridade, densidade, viscosidade, ligação de hidrogênio, podendo dissolver diferentes classes fenólicas que apresentem maior ou menor atividade antioxidante. Além disso, segundo Alberti et al. (2016), a cultivar e o grau de maturação influenciam o teor fenólico presente na fruta. No presente estudo, as maçãs utilizadas estavam em início de senescência, de acordo com o teste iodo-amido proposto por Reid et al. (1982).

2.3.2 Otimização e validação

Os modelos para cada variável resposta propostos pela análise de regressão linear múltipla foram significativos ($p < 0,01$) e não apresentaram falta de ajuste ($p_{\text{ falta de ajuste}} > 0,05$). Tais modelos foram capazes de explicar, no mínimo, 81% da variância dos dados e apresentaram R^2 ajustado maior que 0,75 (Tabela 2.4). As variáveis independentes que apresentaram significância ($p < 0,05$) constam na Tabela 2.4.

Em relação à concentração de solvente, parâmetro mais significativo sobre a concentração de flavonoides totais, apresentou coeficientes de regressão quadráticos com efeito negativo, indicando que a concentração intermediária (60%) poderá resultar em melhores rendimentos. Alberti et al. (2014) notaram melhor rendimento na extração de compostos fenólicos da maçã com metanol 85% em

relação ao 99,9%, indicando que uma solução proveniente da mistura do solvente com água é mais eficaz que a utilização apenas do solvente. Ajila et al. (2011) concluíram que a extração de compostos fenólicos utilizando etanol a 60% apresenta melhor rendimento em comparação ao etanol 70 e 80%. Esse fato provavelmente ocorre uma vez que a utilização de mistura de solventes aumenta a taxa inicial da extração desses compostos devido à melhoria na solubilidade de alguns compostos (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007).

Tabela 2.4 - Efeitos das variáveis independentes (concentração de solvente, temperatura e razão soluto/solvente) sobre a concentração de flavonoides totais e atividade antioxidante (DPPH, FRAP, ABTS).

Variáveis Respostas	Fatores	Coef. de Regressão	Erro padrão	t- valor	p-valor	-95% de confiança	+95% de Confiança
Flavonoides (mg CAT/Kg)	Constante	1397,09	114,66	12,18	<0,0001	1132,69	1661,50
	x_1^2	-411,73	103,35	-3,98	<0,003	-650,07	-173,40
	x_2^2	369,71	70,21	5,26	<0,0007	207,79	531,62
	x_3^2	-252,68	106,14	-2,38	<0,04	-486,29	-19,06
	R^2	0,76					
	ajustado						
	p-valor*	<0,01					
DPPH (μ Mol T/Kg)	Constante	11878,17	697,38	17,03	<0,0001	10270,00	13486,33
	x_3^2	-3044,53	628,61	-4,84	<0,002	-4494,11	-1594,94
	x_1^2	-2346,42	628,61	-3,73	<0,006	-3796,00	-896,84
	x_2^2	1949,24	427,05	4,56	<0,002	964,45	2934,04
	x_2^2	1881,01	628,61	2,99	<0,02	431,43	3330,60
	R^2	0,85					
	R^2	0,79					
FRAP (μ Mol T/Kg)	Constante	9601,54	1201,26	7,99	<0,0001	6831,42	12371,67
	x_3^2	-3735,26	1082,80	-3,45	<0,009	-6232,22	-1238,31
	x_2^2	2850,23	735,62	3,87	<0,005	1153,89	4546,58
	R^2	0,82					
	R^2	0,75					
	ajustado						
	p-valor*	<0,01					
ABTS (μ Mol T/Kg)	Constante	15615,08	912,36	17,11	<0,0001	13511,16	17718,99
	x_3^2	-3933,52	822,39	-4,78	<0,002	-5829,97	-2037,08
	x_1^2	-3331,76	822,39	-4,05	<0,004	-5228,20	-1435,31
	x_2^2	2848,61	558,71	5,10	<0,001	1560,23	4136,99
	R^2	0,86					
	R^2	0,82					
	ajustado						
p-valor*	<0,01						
p-valor**	0,08						

Nota - x_1 : concentração de solvente, x_2 : temperatura, x_3 : razão sólido/líquido, *: modelo e **: falta de ajuste.

Os coeficientes de regressão linear ou quadrático significativos para variável temperatura apresentaram efeito positivo, ou seja, a maior temperatura avaliada deve ser utilizada a fim de obter o melhor rendimento do processo. O aumento da temperatura favorece a solubilidade dos compostos e o coeficiente de difusão do solvente, facilitando a extração. No entanto, esta não deve ser muito elevada uma vez que pode favorecer reações de decomposição dos polifenóis, tais como oxidação, hidrólise, clivagem e polimerização, diminuindo a capacidade antioxidante (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007; THOO et al., 2010; AJILA et al., 2011, PEAPE et al., 2014).

O parâmetro razão sólido/líquido exerceu a maior influência sobre a atividade antioxidante apresentando coeficientes de regressão quadráticos com efeito negativo, sugerindo a utilização da razão intermediária, 1:20 (m/v). De acordo com Yan et al. (2011), a razão sólido/líquido influencia positivamente na concentração final de compostos em um ensaio de extração. No entanto, se a razão sólido/líquido for alta o suficiente para que a concentração de saturação do solvente não seja atingida, o rendimento máximo do processo será definido como a concentração de equilíbrio entre a matriz sólida e o solvente (PINELO et al., 2005). Dessa forma, de acordo com os dados experimentais e com o modelo obtido, haverá solvente em excesso ao utilizar razões superiores a 1:20 (m/v).

Foi possível prever a condição ótima simultânea de todas as variáveis, denominado ponto ótimo, de acordo com Derringer e Suich (1980). A obtenção do ponto ótimo visa determinar um nível para cada variável que, simultaneamente, apresentem o melhor desempenho do sistema (BEZERRA et al., 2008). Foi sugerido que o melhor resultado deve ser obtido utilizando concentração de solvente e razão sólido/líquido intermediárias, ou seja, etanol a 60% na razão 1:20 (m/v). Em relação à temperatura, os maiores rendimentos foram observados com a maior temperatura utilizada, 50 °C.

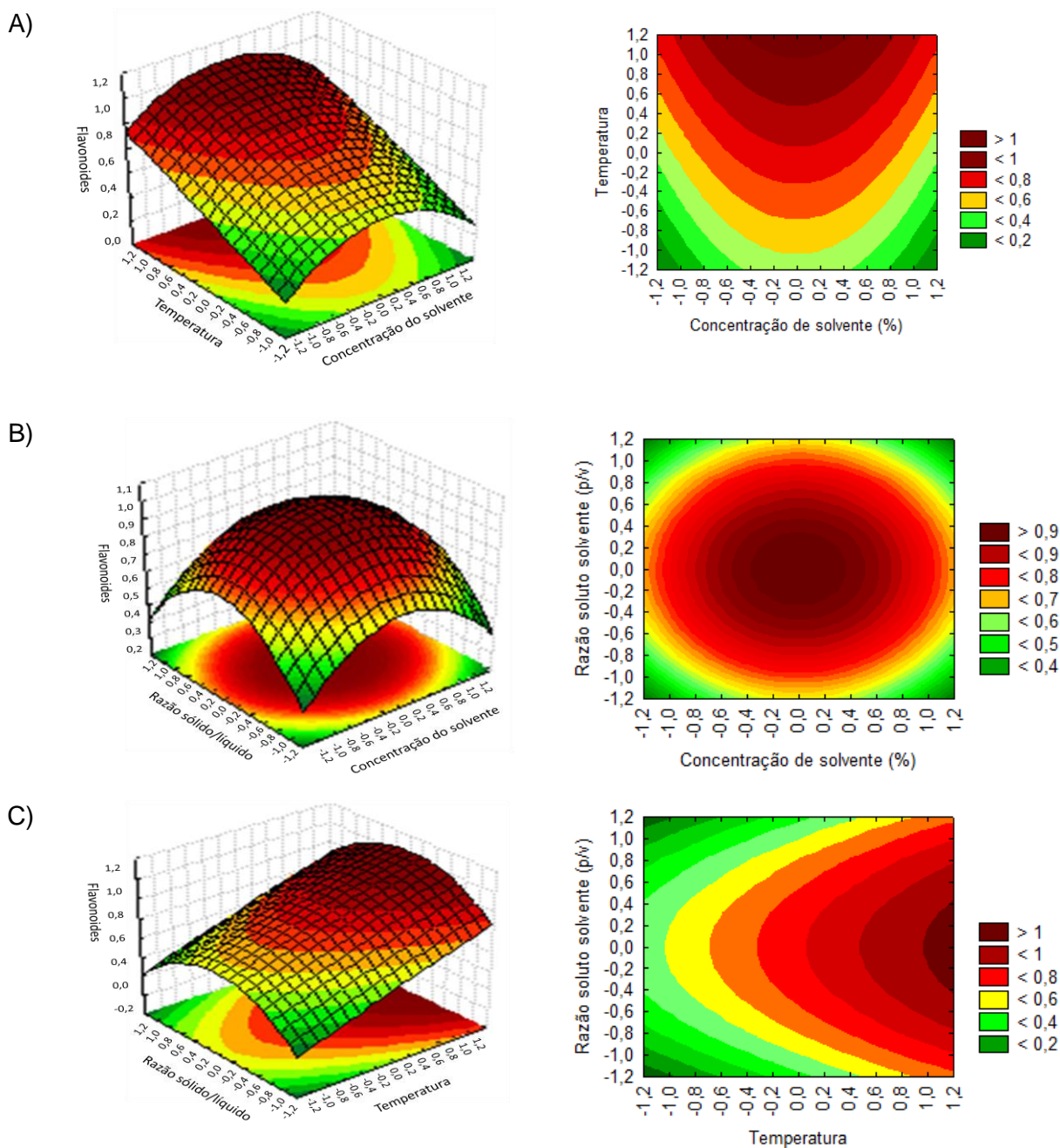


Figura 2.1 - Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes sobre a concentração de flavonoides totais. Nota: A - relação entre temperatura e concentração de solvente, B - entre razão sólido/líquido e concentração de solvente e C - entre razão sólido/líquido e temperatura.

Os valores preditos para cada parâmetro avaliado em condições ótimas estão dispostos na Tabela 2.5, assim como os teores experimentais. Mediante os dados apresentados, o modelo foi validado uma vez que os teores experimentais se aproximaram dos preditos em um intervalo de 95% de confiança. As condições ótimas do planejamento realizado por esses autores apresentam maior gasto energético uma vez que foi sugerido que seja realizada utilizando etanol 56%, a 80°

C por 27 minutos. Além disso, foi utilizado maior quantidade de solvente, 25 mL para 0,25 g de bagaço em pó liofilizado, ou seja, uma razão soluto/solvente de 1:625 m/v.

Tabela 2.5 -Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração.

Variável resposta	Valores			
	Predito	- 95% de confiança	+ 95% de confiança	Experimental
FT (mg CAT/kg)	1887,97	1619,42	2156,524	1735,24 ± 665,47
FA (mg RU/kg)	1688,64	1354,90	2022,37	1954,95 ± 137,22
FO (mg CAT/kg)	1072,68	905,99	1239,37	1039,52 ± 11,14
DPPH (µmol TE/kg)	14984,96	12775,35	17194,56	13402,96 ± 407,98
FRAP (µmol TE/kg)	13910,42	10959,97	16860,86	14657,80 ± 1194,67
ABTS (µmol TE/kg)	19229,92	17172,33	21287,52	19853,63 ± 810,82

Nota: FT: flavonoides totais, FA: flavanóis, FO: flavonóis.

2.3.3 Compostos fenólicos individuais

Analisando os fenóis individuais monoméricos (Tabela 2.6), a extração realizada nas condições otimizadas se mostrou eficiente na extração de glicosídeos de quercetina (371,2 mg/kg), compostos detectados principalmente no epicarpo da maçã, os quais geralmente não são transferidos para o suco (KARAMAN et al., 2012). Segundo Grigoras et al. (2013) os derivados de quercetina são os principais fenóis individuais dentre os flavonoides detectados em extratos alcoólicos do bagaço de maçã. Além disso, foram quantificados teores de ácido clorogênico e floridzina, os quais são os principais fenóis monoméricos encontrados em maçãs (ALBERTI et al., 2017).

Tabela 2.6 - Perfil fenólico do extrato obtido nas condições otimizadas.

Classes fenólicas	Concentração (mg/kg)
Ácidos fenólicos	
Ácido Clorogênico	212,39 ± 0,22
Flavonoides	
<i>Flavanóis</i>	
Hiperosídeo	188,58 ± 0,17
Rutina	102,40 ± 0,10
Isoquercetina	2,64 ± 0,07
Reinourtrina	1,72 ± 0,01
Quercitrina	61,4 ± 0,1
Avicularina	67,74 ± 0,01
<i>Dihidrochalconas</i>	
Floridzina	262,99 ± 0,07

Portanto, parte dos compostos fenólicos que permanece no bagaço durante o processamento pode ser recuperada por meio de uma extração utilizando uma solução hidroalcoólica em condições ideais. Tal extrato poderá ser uma alternativa a fim de aproveitar esse subproduto industrial além de melhorar as características sensoriais e nutricionais de produtos derivados da maçã.

2.3.4 Cinética da Extração

Os resultados referentes aos teores de flavonoides nos ensaios de extração a 20, 35 e 50 °C das amostras em função do tempo (Figura 2.2) indicam que o rendimento de extração aumenta com o passar do tempo até atingir a concentração máxima, quando o sistema entra em equilíbrio. Segundo Pinelo; Zornoza e Meyer (2008), os quais estudaram a cinética da extração fenólica do epicarpo da maçã, o processo pode ser dividido em três fases. Na primeira fase, nos primeiros segundos da extração, 40 a 50% dos compostos fenólicos são rapidamente difundidos no solvente, devido à sua penetração facilitada pelos poros da matriz sólida. A velocidade de difusão passa a ser constante, caracterizando a segunda fase, na qual, provavelmente, ocorre liberação dos fenóis com a passagem do solvente nas condições da extração. Por fim, na terceira e última fase, a difusão ocorre lentamente seguindo uma curva exponencial até atingir o rendimento máximo, provavelmente, atribuído ao momento em que as concentrações do sólido e do solvente se igualam, uma vez que o gradiente de concentração é a força motriz durante a transferência de massa (PINELO et al., 2005).

De acordo com Amendola, De Faveri e Spigno (2010), aparentemente, a concentração de equilíbrio da extração ocorre independente das condições de extração. Pode ser observado, no presente estudo (Figura 2.2), que o ponto máximo em todas as temperaturas avaliadas ocorreu em aproximadamente 50 minutos. No entanto, a extração em condições otimizadas foi realizada durante o período de 20 minutos. Segundo os dados obtidos no estudo cinético, em 20 minutos a concentração foi de 1732,96 mg/kg enquanto que a concentração de equilíbrio, cerca de 50 minutos, foi de 1852,77 mg/kg, 6,46% maior. Portanto, tendo em vista o custo de processo, o tempo de extração de 20 minutos, como apresentado no planejamento utilizado, seria economicamente mais vantajoso.

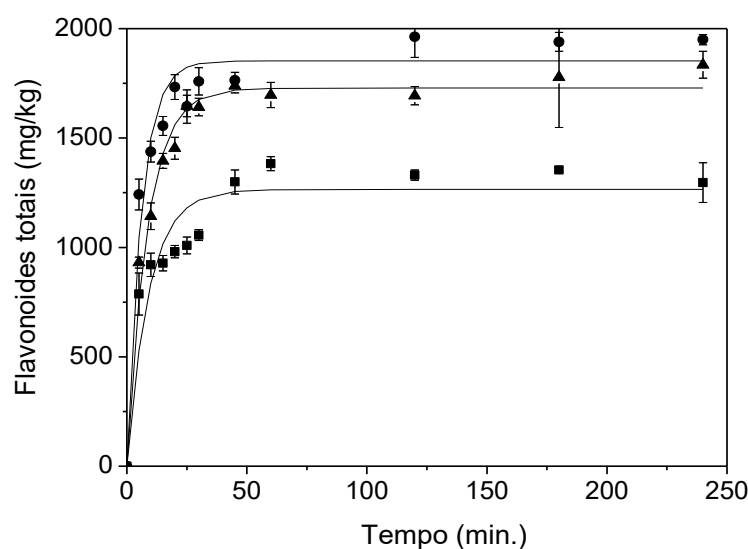


Figura 2.2 - Efeito das variáveis tempo e temperatura no rendimento da extração de flavonoides totais do bagaço de maçã. Nota: ●: 50 °C, ▲: 35 °C e ■: 20 °C.

Os dados foram bem ajustados ao modelo cinético não linear de primeira ordem (Tabela 2.7), com valores de R^2 variando de 0,88 a 0,98 e erro percentual médio menor que 0,95%. As concentrações de equilíbrio (C_{eq}), bem como as constantes de transferência de massa (k) foram determinadas para cada temperatura utilizada. A extração realizada a 50 °C apresentou valor de k 52,29% maior que o obtido a 20 °C, uma vez que o aumento da temperatura facilita a permeabilidade do solvente na parede celular da matriz sólida devido ao aumento do coeficiente de difusão, favorecendo a solubilidade dos compostos (AL-FARSI; LEE, 2008; THOO et al., 2010).

O aumento da taxa de transferência de massa resultou em diferenças significativas entre as temperaturas avaliadas no tempo de rendimento máximo ($p < 0,05$), o qual apresentou concentrações mais elevadas quanto maior a temperatura, segundo o teste de Fisher. No entanto, o rendimento final da extração não apresentou diferenças significativas entre as temperaturas de 35 e 50 °C. Tal resultado está de acordo com Linares et al. (2010), os quais realizaram a cinética da extração fenólica da erva mate à 40, 50, 60 e 70 °C e verificaram que aumento da temperatura acelera a taxa inicial da extração, no entanto, não altera significativamente o rendimento final. Apesar dos efeitos positivos que a utilização de temperaturas elevadas confere ao rendimento da extração, a temperatura não pode ser aumentada indefinidamente neste tipo de processo, uma vez que a

estabilidade dos compostos pode ser comprometida em temperaturas acima de 50 °C (CACACE; MEZZA, 2003; PINELO et al., 2005).

Tabela 2.7 -Parâmetros obtidos no modelo cinético de primeira ordem.

T (°C)	C _{eq} (mg/kg)	Parâmetros cinéticos			
		k (min ⁻¹)	R ² ajustado	RSME	E (%)
20	1265,29	0,109	0,88	166,45	0,95
35	1728,35	0,117	0,98	94,96	0,67
50	1852,77	0,166	0,95	154,24	0,22

Nota: T: temperatura, C_{eq}: concentração de equilíbrio, k: constante de transferência de massa, RSME: desvio médio quadrático, E (%): erro percentual médio absoluto.

Os valores de $\ln k$ e $1/T$ foram utilizados para traçar uma reta e seus dados foram ajustados na Equação de Arrhenius (Equação 3) para obtenção da energia de ativação. O processo de extração utilizado apresentou valor de $9,01 \text{ kJ mol}^{-1}$, sendo essa a quantidade de energia requerida pela molécula para que ocorra a transferência do soluto para o solvente. A energia de ativação depende do tipo composto de interesse, da matriz do alimento, dos procedimentos realizados antes da extração, entre outros fatores (SANT'ANNA, MARCZAK E TESSARO, 2013). Bucic-Kojic et al. (2007) verificaram que 8 kJ mol^{-1} seria suficiente para extrair polifenóis em semente de uva que apresentavam partículas maiores que $0,65 \text{ mm}$.

2.3.5 Estabilidade

Houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações dos compostos nas diferentes condições de pH's e temperaturas as quais os extratos foram expostos durante o período de 90 dias de armazenamento (Figura 2.3). Esse fato pode ocorrer, em partes, devido ao aumento da taxa de oxidação com o aumento do pH (ROGISKI; ALEGRIA, 2005). Além disso, o aumento da temperatura de armazenamento, geralmente, favorece as reações de degradação dos polifenóis (PEAPE et al., 2014).

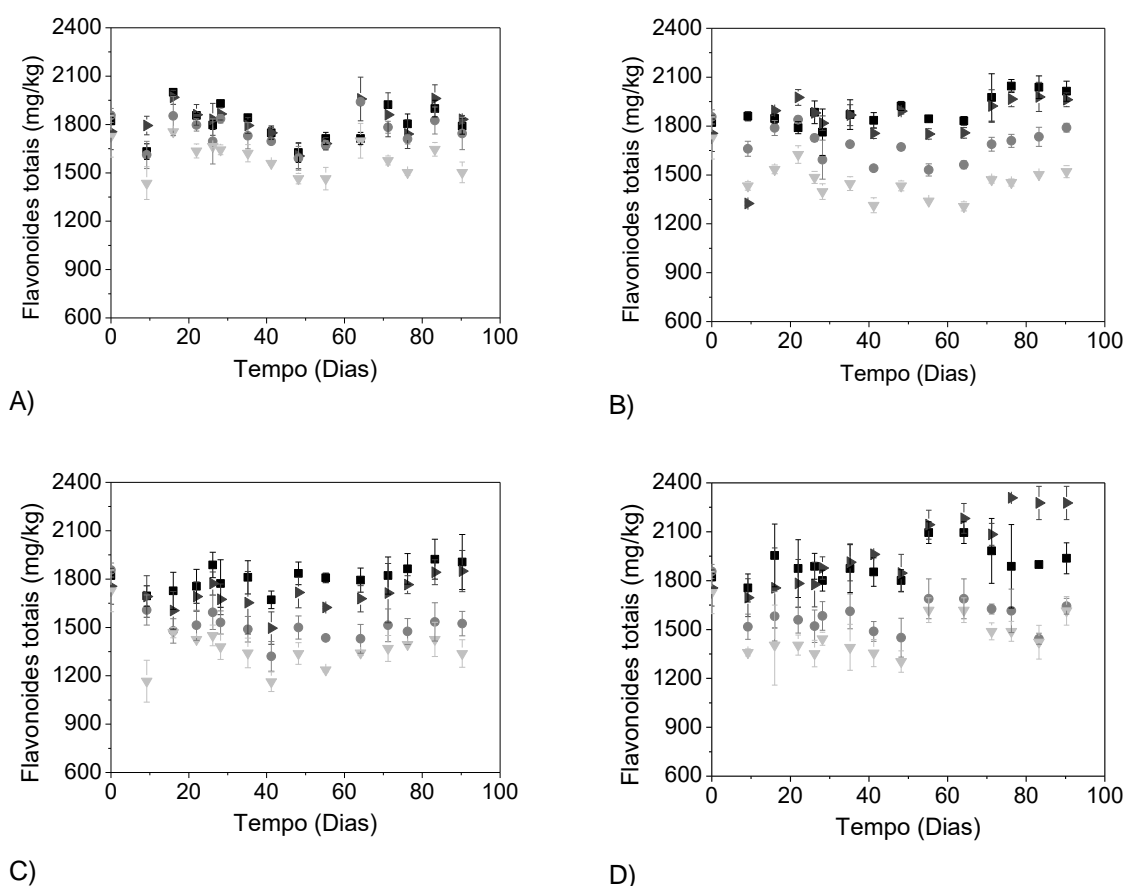


Figura 2.3 - Efeito da temperatura e pH no teor de flavonoides totais dos extratos durante o período de 90 dias de armazenamento. Nota: Temperaturas: A) 10° C, B) 20° C, C) 35° C, D) 62° C. pH's: ■ - 3,5, ► - 4,5, ● - 5,5, ▼ - 6,5.

O efeito do tempo sob o teor de flavonoides totais gerou uma pequena variação durante os noventa dias de armazenamento, provavelmente, devido às múltiplas reações envolvidas, tais como oxidação, isomerização e clivagem, como descritas em estudos de degradação de polifenóis presentes em chá (LI et al., 2013) e em suco de maçã (VAN DER SLUIS; DEKKER; VAN BOEKEL, 2005). Esses últimos autores discutiram que as reações responsáveis pela degradação se diferenciam de acordo com a classe e/ou subclasse dos polifenóis. O ácido clorogênico, principal substrato da polifenoloxidase, passa por reações oxidativas. No entanto, reações não oxidativas também podem ser responsáveis pela degradação desses compostos. Quanto aos glicosídeos de quercetina, não apresentaram degradação oxidativa. As reações responsáveis pela degradação foram atribuídas ao somatório das taxas de reações não oxidativas e de hidrólise, a qual ocorreu independente da temperatura na faixa de 70-100 °C. Em relação à

floridzina, composto mais estável durante o armazenamento, as reações envolvidas foram apenas não oxidativas.

Sendo assim, os flavonoides presentes no extrato podem permanecer estáveis se este for adicionado em alimentos ou bebidas que apresentam baixo pH (aproximadamente 3,5). Cabe ainda ressaltar que a conservação sob temperaturas em torno de 10 °C (refrigeração) pode retardar a degradação desses compostos.

2.4 CONCLUSÃO

Foi possível otimizar as condições das variáveis simultaneamente por meio do método de superfície de resposta o qual sugeriu que a extração seja conduzida utilizando etanol 60% como solvente, a 50 °C e razão sólido/líquido 1:20 (m/V). O estudo cinético permitiu a determinação do rendimento máximo, quando ocorre o equilíbrio do sistema, aproximadamente aos 50 minutos. No entanto, foi observado que o tempo de 20 minutos pode ser vantajoso no ponto de vista econômico, uma vez que rendimento foi 6,46% menor. Com relação aos fenóis individuais, os glicosídeos de quercitina, compostos presentes no epicarpo da fruta, foram os principais flavonoides detectados. Dessa forma, o extrato fenólico obtido em condições otimizadas pode ser uma alternativa para incorporar compostos retidos no bagaço em produtos alimentícios, sendo sugerido que este seja adicionado em alimentos e bebidas que apresentam baixo pH, armazenados em temperatura de refrigeração a fim minimizar a degradação dos flavonoides.

CAPÍTULO 3

EFEITO DA REINCORPORAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DA MAÇÃ NO PROCESSO FERMENTATIVO DA SIDRA

RESUMO

A composição fenólica da maçã além de conferir benefícios à saúde do consumidor influencia algumas características sensoriais das bebidas derivadas dessa fruta. No entanto, 42 a 58% desses compostos ficam retidos no bagaço, o qual apresenta a classe de flavonoides como a principal. Por esse motivo, o objetivo do presente capítulo foi reincorporar flavonoides retidos no bagaço por meio de um extrato hidroalcoólico e avaliar seus efeitos durante o processo fermentativo da sidra. O extrato do bagaço foi obtido nas condições otimizadas (etanol 60%, temperatura de 50 °C e razão sólido/líquido 1:20, m/v). O mosto foi dividido em duas partes, denominados mosto I e II. Ao mosto II foi adicionado o extrato liofilizado, aumentando cerca de 40% da composição de flavonoides totais. Os mostos foram inoculados com levedura, sendo fermentados sob as mesmas condições durante 15 dias. A fermentação foi monitorada por meio da perda de massa devido à liberação de gás carbônico e contagem de células viáveis. O processo foi interrompido nos dias 1, 4, 7, 11 e 15 a fim de avaliar os efeitos da adição de extrato. Os teores dos compostos fenólicos individuais, açúcares e etanol foram quantificados por CLAE em cada ponto. Além disso, foi determinada a composição fenólica total, flavonoides totais, flavonóis, flavanóis e atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos de DPPH, ABTS, FRAP e CUPRAC, bem como pH, acidez titulável e cor das amostras durante o processo fermentativo. Além disso, foi avaliada a intensidade dos atributos sensoriais: cor, amargor, adstringência, acidez e qualidade de odor das sidras sem e com adição de extrato. Os compostos fenólicos individuais variaram durante o processo fermentativo. A sidra II apresentou teores de glicosídeos de quercitina, compostos presentes apenas no epicarpo da maçã. A adição do extrato resultou em aumento na atividade antioxidante, com média de 41,87% em relação ao controle. A adição do extrato não prejudicou a qualidade do aroma e influenciou atributos sensoriais, resultando em uma sidra com maior intensidade e menor tonalidade de cor, maior percepção de amargor e adstringência e menor percepção de acidez. Portanto, a adição do extrato melhorou a característica funcional da sidra, aumentando sua capacidade antioxidante além de alterar as características sensoriais responsáveis pela aceitabilidade da bebida.

Palavras-chave: Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); compostos bioativos; análise de componentes principais (ACP); atividade antioxidante; análise sensorial.

3.1 INTRODUÇÃO

A sidra, bebida obtida por meio da fermentação alcoólica total ou parcial dos açúcares fermentescíveis presentes no mosto da maçã (BRASIL, 2008), pode ser considerada um dos principais produtos agroindustriais desta fruta (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). A composição das maçãs destinadas a esse fim influencia a qualidade do produto final (GUYOT et al., 1998). As sidras produzidas a partir de cultivares industriais específicas, as quais apresentam teor médio de 2707 mg/kg de compostos fenólicos totais, podem apresentar diferenças em comparação à sidra proveniente de maçãs de mesa, com teor médio de 1022 mg/kg (NOGUEIRA, 2003; VERDU et al., 2014; ZARDO et al., 2015). O conteúdo fenólico pode ser responsável por alterações nas características sensoriais como cor, acidez, adstringência e formação de certos compostos aromáticos (ZARDO et al., 2008; YE; YUE; YUAN, 2014, LAAKSONEN et al., 2017).

Durante o processamento, 42 a 58% da composição fenólica da maçã permanecem no bagaço, subproduto gerado após a prensagem para obtenção do suco ou mosto (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012; VAN DER SLUIS et al., 2002). Principalmente os fenóis presentes na casca não são transferidos para o suco devido a interações moleculares como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas que estes realizam com as paredes celulares (GUYOT et al., 2003, LE BOURVELLEC; GUYOT; RENARD, 2004; VAN DER SUITS et al., 2001). Dessa forma, o bagaço da maçã apresenta, em média, 85% de compostos pertencentes à classe de flavonoides em sua composição fenólica total (CAM, AABY, 2010; REIS; RAI; ABU-GRANNAM, 2012). Estes compostos se destacam em relação à capacidade antioxidante devido ao elevado potencial redox (TSAO; YANG, 2003).

Sendo assim, a reincorporação dos compostos retidos no bagaço pode aumentar a capacidade antioxidante do produto final além de melhorar as características sensoriais da sidra elaborada com maçãs de mesa. Portanto, o presente capítulo tem como objetivo adicionar o extrato fenólico obtido nas condições otimizadas ao mosto de maçã e avaliar seu efeito no processo fermentativo e na qualidade sensorial da sidra.

3.2 MATERIAS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

Foram utilizadas maçãs das cultivares Gala e Fuji adquiridas no comércio local, município de Ponta Grossa (25° 05' 42" S 50° 09' 43" O), Paraná, Brasil. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* Reims (Fermol Reims Champagne, ref. PB 2002, AEB Group, San Polo, Brecia, Itália) foi o microrganismo utilizado como inóculo para a fermentação alcoólica do mosto na forma seca ativa.

Os reagentes, padrões e sistema de Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) utilizados foram os mesmos apresentados no capítulo 2.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Obtenção do mosto e bagaço

A obtenção do mosto e bagaço seguiu o mesmo procedimento descrito no Capítulo 2 (item 2.2.2.1). O mosto foi despectinizado por meio da adição da enzima pectinase (Pectinex 3XL, Novozymes do Brasil) na concentração de 3,0 mL/hL, durante 60 minutos a 45 °C, sendo trasfegado após sedimentação. O bagaço gerado nesse processo foi desidratado, triturado e tamisado conforme a Figura 3.1.

3.2.2.2 Extração dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos do bagaço foi realizada conforme as condições otimizadas do Capítulo 2 (item 2.3.2) etanol 60%, temperatura de 50 °C e razão sólido/líquido 1:20 (m/v) durante o período de 20 minutos. Após esse período de tempo, o bagaço foi imediatamente removido por filtração. Em seguida, os extratos foram centrifugados (HITACHI KOKI Co. Ltda., CR21GII, Japão) rotaevaporados a 50 °C (TECNAL, TE-211, SP, Brasil), seguido de ultracongelamento à -86 °C (NUAIRE, NU-9668GC, MN, USA) e liofilização (TERRONI, LS3000, SP, Brasil).

3.2.2.3 Elaboração das sidras com e sem adição de extrato

De acordo com a Figura 3.1, o mosto despectinizado foi dividido em duas porções, mosto I e mosto II. O extrato fenólico liofilizado foi adicionado apenas ao mosto II, com base na concentração de flavonoides totais, principal classe fenólica presente no bagaço. O cálculo para a quantidade adicionada foi efetuado considerando a concentração extraída nas condições avaliadas e a quantidade de bagaço gerado. Tendo a concentração de flavonoides de 1735,24 mg/kg de bagaço seco, o qual continha 90% de umidade e representava 40% do total de maçã processada, foi verificado que a adição deveria visar a um aumento de aproximadamente 40%. O mosto I, portanto, foi o controle, sem adição de extrato.

Os mostos foram fermentados nas mesmas condições, de acordo com Nogueira et al. (2007), por meio de inóculo de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 20 g/hL, reidratada conforme indicação do fabricante. Após a adição do inóculo, o conteúdo dos fermentadores passou a se chamar sidra I e sidra II, sem e com adição de extrato, respectivamente. A fermentação foi conduzida à temperatura ambiente (20 °C) em uma B.O.D. (LABOR SP-500, SP, Brasil) por um período de quinze (15) dias. Dez (10) fermentadores (erlenmeyers) foram utilizados, sendo cinco (5) para cada um dos experimentos, com capacidade volumétrica total de 500 mL e volume útil de 450 mL, munidos de batoque com solução de metabissulfito de potássio na concentração de 300 mg/L (Figura 3.2).

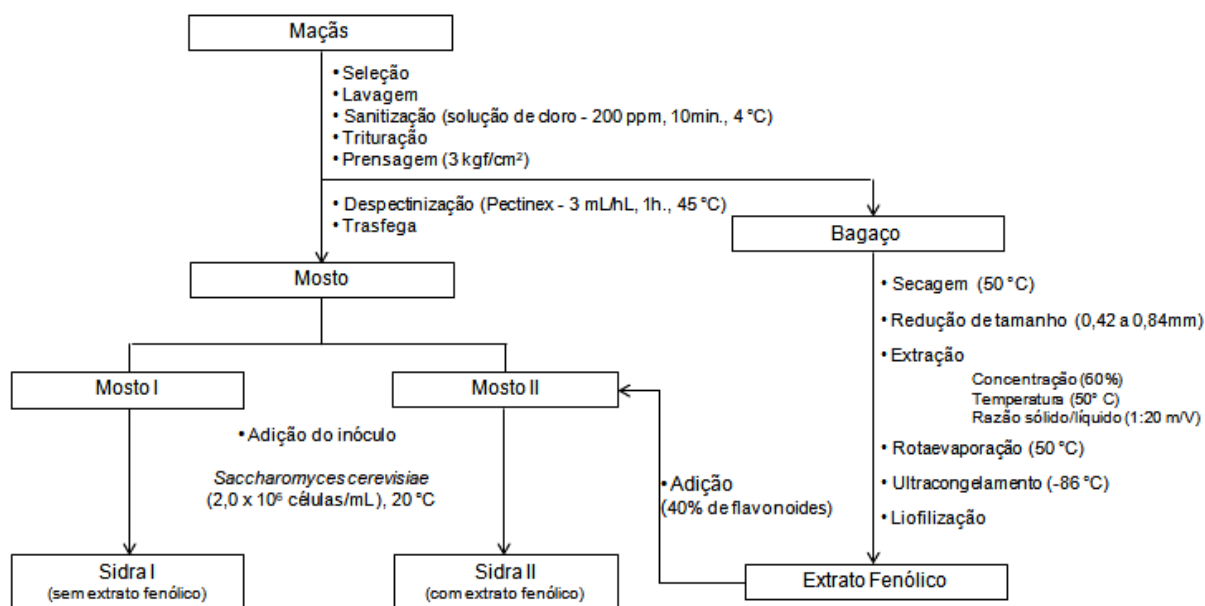


Figura 3.1 - Fluxograma da elaboração do mosto de maçã, extrato fenólico do bagaço e sidra com e sem adição de extrato fenólico.

O processo fermentativo para obtenção das sidras I e II foi monitorado por meio de uma cinética de fermentação utilizando como parâmetro a diminuição da massa em função do tempo, devido à liberação de gás carbônico. Além disso, nos dias 1, 4, 7, 11 e 15 a fermentação foi interrompida, sendo retirado um fermentador de cada experimento.

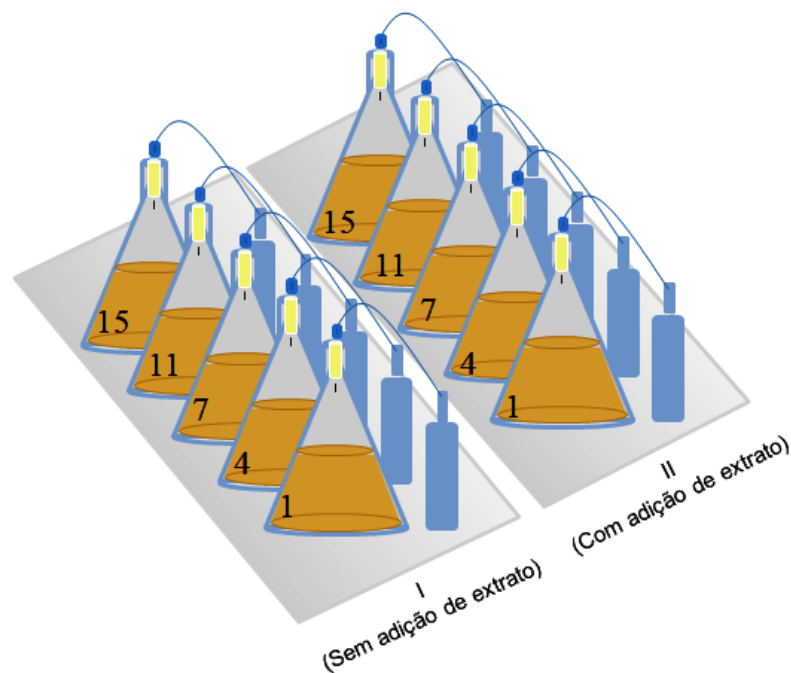


Figura 3.2 - Esquema do sistema de fermentação demonstrando os dias em que a fermentação foi interrompida para monitoramento dos efeitos da adição do extrato fenólico.

3.2.2.4 Amostragem e caracterização das sidras

Foi realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer imediatamente após a interrupção da fermentação em cada ponto por meio da contagem direta em microscópio óptico, utilizando o corante azul de metileno (XB-K-25, SMIC, China), de acordo com Bonneu et al. (1991). Em seguida, o conteúdo dos fermentadores foi centrifugado (HITACHI KOKI Co. Ltda., CR21GII, Japão) a 7980 x g, a 4° C por 15 minutos objetivando a separação da sidra e biomassa de levedura. Na sequência, as amostras de cada ponto foram armazenadas a -18 °C (Metalfrio DA 550, SP, Brasil) até o momento das análises. Uma alíquota de 10 mL de cada amostra foi ultracongelada à -86 °C (NUAIRE, NU-9668GC, MN, USA), liofilizada (TERRONI, LS3000, SP, Brasil) e reconstituída por meio da adição de 5 mL de solução de ácido acético e metanol 2,5% (3:1 v/v) para a análise dos compostos fenólicos individuais em CLAE. Em seguida, cada amostra foi filtrada por meio de um filtro seringa (Waters, Milford, MA, USA) com porosidade de 0,22 µm. O pH das sidras foi determinado utilizando potenciômetro de bancada (Tecnal, TEC 3- MP, SP, Brasil) e a acidez total titulável de acordo com a AOAC (2016), expressa em teor de ácido málico (g/100mL).

3.2.2.4.1 Análise colorimétrica

A análise colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro (Konica Minolta, CM 5, Japão) o qual fornece os valores de L*, a* e b*, utilizados para calcular o valor de *Chroma* (intensidade de cor) e ângulo *hue* (tonalidade), de acordo com as Equações 1 e 2.

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (1)$$

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) \text{ quando } a^* > 0 \quad (2)$$

$$h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*) + 180^\circ \text{ quando } a^* < 0 \quad (2)$$

3.2.2.4.2 Composição fenólica

Compostos fenólicos totais: Quantificados de acordo com o método descrito por Singleton e Rossi (1965), com adaptações. A leitura das absorvâncias foi efetuada em espectrofotômetro (SHIMADZU, UVmini-1240, SP, Brasil) a 720 nm. As concentrações foram calculadas a partir de uma curva padrão de ácido clorogênico ($CFT = 1612,90 \times \text{absorbância}$; $R^2 = 0,9932$) previamente preparada e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido clorogênico por litro (mg EAC/L).

Flavonoides totais: Determinados de acordo com Zhishen, Mengheng e Jianming (1999), com adaptações, sendo efetuada a leitura da absorvância a 510 nm. A concentração foi obtida a partir de uma curva padrão de catequina ($FT = 420,17 \times \text{absorbância}$; $R^2 = 0,9981$) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de catequina por litro (mg ECAT/L).

Flavanóis: Determinada por meio do método adaptado descrito por Broadhurst e Jones (1978), com leitura em espectrofotômetro a 510 nm. Foi calculada a concentração por meio de uma curva padrão de catequina ($\text{Flavanóis} = 625 \times \text{absorbância}$; $R^2 = 0,9978$), obtendo os resultados em miligramas equivalentes de catequina por litro (mg ECAT/L).

Flavonóis: De acordo com Kumaran; Karunakaran (2007), com adaptações, sendo procedida a leitura da absorvância a 440 nm. A concentração foi expressa em miligramas equivalentes de Quercetina-3-rutinosídeo por litro (mg EQRU/L) em relação à uma curva padrão previamente preparada ($\text{Flavonóis} = 232,56 \times \text{absorbância}$; $R^2 = 0,9981$).

Compostos fenólicos individuais: Quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo Alberti et al. (2014), nas mesmas condições citadas no capítulo 2.

3.2.2.4.3 Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada por meio dos métodos espectrofotométricos de FRAP, poder antioxidante de redução do ferro, descrita por Benzie e Strain (1996); CUPRAC, poder de redução do cobre (APAK et al., 2008); captura do radical livre DPPH, de acordo com Brand-Willians; Cuvelier e Berset

(1995) e método de descoloração do cátion ABTS (RE et al., 1999). As leituras das absorvâncias foram efetuadas nos comprimentos de 593, 450, 517 e 765 nm, respectivamente para cada método, após o período de 30 minutos de incubação sob ausência de luz.

Os resultados referentes à capacidade antioxidante foram todos expressos em micromols equivalentes de Trolox por litro ($\mu\text{mol TE/L}$) em relação a uma curva padrão preparada para cada método (FRAP = $1041,66 \times$ absorvância; $R^2 = 0,9986$; CUPRAC = $3333,33 \times$ absorvância; $R^2 = 0,9969$; DPPH = $22,72 \times$ absorvância; $R^2 = 0,9946$ e ABTS = $4,48 \times$ absorvância, $R^2 = 0,9944$).

3.2.2.4.4 Determinação das concentrações de açúcares e etanol

Os teores de açúcares e etanol foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência associada a um detector de índice de refração (CLAE – IR) mantido a $50\text{ }^\circ\text{C}$. Para a determinação dos açúcares, foi utilizado um sistema de eluição isocrático, sob fluxo de $0,5\text{ mL/min.}$ de uma solução aquosa de acetato de cálcio $0,016\text{ g/L}$. A separação dos compostos ocorreu na coluna Sugar PakTM ($300 \times 6,5\text{ mm i.d.}$), mantida a $80\text{ }^\circ\text{C}$, exceto para a quantificação de etanol, quando a temperatura da coluna permaneceu em $64\text{ }^\circ\text{C}$ (ZIELINSKI et al., 2014). A detecção das amostras foi realizada por comparação com os tempos de retenção dos padrões (Tabela 3.1).

Tabela 3.1- Parâmetros cromatográficos dos padrões de açúcares e etanol utilizados.

Composto	TR (min.)	Equações	R^2	LOD*	LOQ*
Etanol	14,61	$y = 317019x + 56005$	0,989	0,583	1,767
Sorbitol	19,10	$y = 827900x + 47355$	0,999	0,189	0,572
Sacarose	8,00	$y = 943272x + 24168$	0,999	0,085	0,256
Glucose	9,70	$y = 962786x - 2742$	0,999	0,009	0,028
Frutose	12,18	$y = 925797x - 66006$	0,999	0,235	0,713

Nota: TR: tempo de retenção; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; *: $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi iniciada após a aprovação do projeto CAAE 62047516.3.0000.0105 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), sendo realizada de acordo com o método proposto por Madrera, Lobo e Alonso (2010), com adaptações. As amostras foram avaliadas por oito (8) julgadores selecionados e

treinados, sendo dois (2) homens e seis (6) mulheres com idade entre 23-41 anos. Os julgadores selecionados apreciavam e consumiam esse tipo de bebida com frequência. Além disso, receberam informações sobre a elaboração do produto e não apresentavam problemas de saúde nem faziam uso de medicamentos que impeçam o consumo de bebida alcoólica.

I.

Nome _____ Data: _____

Você está recebendo amostras codificadas de fermentado de maçã. Por favor, prove-as e ordene-as conforme escala apropriada quanto à intensidade de _____.

Amostra _____

① Muito fraco ③ Fraco ⑤ Moderado ⑦ Forte ⑨ Muito forte

II.

Nome _____ Data: _____

Você está recebendo duas amostras codificadas de fermentado de maçã. Por favor, prove as amostras e avalie na escala apropriada quanto à intensidade de _____.

Amostra: _____

① Muito fraco ② ③ Fraco ④ ⑤ Moderado ⑥ ⑦ Forte ⑧ ⑨ Muito forte

Amostra: _____

① Muito fraco ② ③ Fraco ④ ⑤ Moderado ⑥ ⑦ Forte ⑧ ⑨ Muito forte

III.

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra codificada de fermentado de maçã. Por favor, avalie a qualidade do odor e atribua nota conforme a escala hedônica apresentada.

Amostra: _____

Nota: _____

1 Desgostei muitíssimo
2 Desgostei muito
3 Desgostei moderadamente
4 Desgostei ligeiramente
5 Indiferente
6 Gostei ligeiramente
7 Gostei moderadamente
8 Gostei muito
9 Gostei muitíssimo

Figura 3.3 - Fichas para avaliação sensorial. Nota: I.: Familiarização e ordenação das escalas de referência; II: Avaliação da intensidade dos atributos cor, amargor, adstringência e acidez e III.: avaliação da qualidade do odor.

O experimento durou cerca de três (3) meses, incluindo as sessões nas quais os julgadores se familiarizaram com as amostras até chegar a um consenso dos atributos a serem avaliados. O treinamento foi realizado com uma escala de referência para cada atributo pré-definidos pelos julgadores - cor, amargor, acidez e

adstringência - variando de menos para mais intenso, sendo 1-muito fraco, 3-fraco, 5-moderado, 7-forte e 9-muito forte. A amostra controle (sem adição) foi utilizada como base para elaboração das escalas de referência. Soluções iniciais de cafeína 0,2%, ácido cítrico 50% e ácido tânico 0,5% foram adicionadas à base, obtendo-se as escalas de amargor, acidez e adstringência, respectivamente. As escalas finais variaram de 20 a 100 mg/100mL para amargor, de 3 a 40 mg/100mL para acidez e de 0 a 0,9 mg/100mL para adstringência. A escala de cor foi realizada por meio da diluição e adição de suco de maçã. Os julgadores provaram e se familiarizaram com a escala numerada e, posteriormente, receberam a escala codificada, a qual deveria ser colocada em ordem (Figura 3.3). Os julgadores foram considerados aptos para avaliar as amostras quando acertavam a ordem em duplicata.

Após o período de treinamento, os atributos foram avaliados, em duplicata, por meio da escala estruturada de nove (9) pontos. No momento da avaliação, cada avaliador recebeu, além das amostras, a escala de referência ao atributo em questão. Além disso, a qualidade do odor foi avaliada por meio de uma escala hedônica de aceitação com nove (9) pontos, variando de 1-desgostei muitíssimo a 9-gostei muitíssimo (Figura 3.3).

3.2.2.6 Estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. A homogeneidade das variâncias de cada variável foi verificada pelo teste F ou de Levene ($p \geq 0,05$). As diferenças entre as amostras foram avaliadas por meio do teste t-Student ou pela análise de variância (ANOVA, fator único), seguido de teste de médias de Fischer LSD. Os produtos de Pearson (r) foram utilizados para avaliar a força de correlação entre os parâmetros analisados. Foi considerado significativo p-valor abaixo de 0,05. Os dados obtidos na avaliação sensorial foram submetidos à análise quimiométrica, relacionando os tratamentos utilizados com os atributos sensoriais das sidras por meio da análise dos componentes principais (ACP). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA v. 13.2 (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Cinética da fermentação

A partir dos dados obtidos pelo monitoramento da perda de massa dos fermentadores no decorrer do período de fermentação, bem como da contagem de células viáveis, foi possível obter alguns parâmetros cinéticos. A velocidade máxima do processo fermentativo foi de 19,35 e 19,74 (g/Ld), respectivamente para os tratamentos I e II. A sidra I apresentou taxa máxima de produção de CO₂ de 19,35 g/Ld e a sidra II, 19,74 g/Ld. A população máxima de leveduras, no final do processo fermentativo, apresentou contagem de $7,8 \times 10^7$ UFC/mL na sidra I e $6,3 \times 10^7$ UFC/mL na sidra II, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Desta forma, a adição do extrato não influenciou a cinética do processo fermentativo.

Os teores de etanol nos tratamentos I e II, sem e com adição de extrato, não apresentaram diferenças significativas até o quarto dia de fermentação (Figura 3.4). Ao passo que as concentrações de açúcares e sorbitol diferenciaram significativamente entre os dois tratamentos durante todo o processo fermentativo; exceto o teor de sacarose, que se igualou a partir do 4º dia. De acordo com Gomis et al. (1988), os teores de açúcares, etanol, sorbitol e glicerol podem exercer influência na formação do aroma e algumas percepções sensoriais durante o processo fermentativo.

O mosto II apresentou maiores teores de glucose e frutose, com valores de 17,60 e 8,65%, respectivamente (Figura 3.4). Tal fato provavelmente ocorreu devido à presença de açúcares no extrato, uma vez que o solvente utilizado solubiliza o conteúdo de açúcares do bagaço durante o processo de extração. Os açúcares presentes no mosto foram reduzidos durante o período de fermentação, uma vez que estes fornecem energia para a ocorrência das reações metabólicas necessárias ao crescimento e multiplicação das leveduras, as quais apresentam o etanol e o gás carbônico como principais produtos do processo (NOGUEIRA; WOSIACKI 2012). Dessa forma, a maior produção de etanol na sidra II a partir do quarto dia, resultando em maior teor alcoólico final (7,67%) em comparação à sidra I (7,18%), pode ser atribuída à diferença na concentração de açúcares.

As concentrações de frutose, sacarose e sorbitol em ambos os mostos, estão de acordo com Alberti et al. (2016), os quais detectaram teores de 73,7, 40,9 e 7,2 g/L aos respectivos compostos para a cultivar Fuji suprema. O teor de sacarose decresceu desde o início da fermentação, não sendo mais detectada a partir do primeiro dia de fermentação. Os teores de glucose e frutose, no entanto, começaram a ser reduzidos após o primeiro dia de fermentação. Esse fato ocorre uma vez que apenas os açúcares simples (glucose e frutose) podem ser metabolizados pela levedura, portanto, seus teores aumentam no início da fermentação devido à reação necessária de hidrólise da sacarose por ação da invertase, enzima produzida pela levedura (NOGUEIRA; WOSIACKI 2012). A sidra II, com adição de extrato, apresentou concentração remanescente de frutose no final dos quinze dias de fermentação, com teor 0,32 g/L.

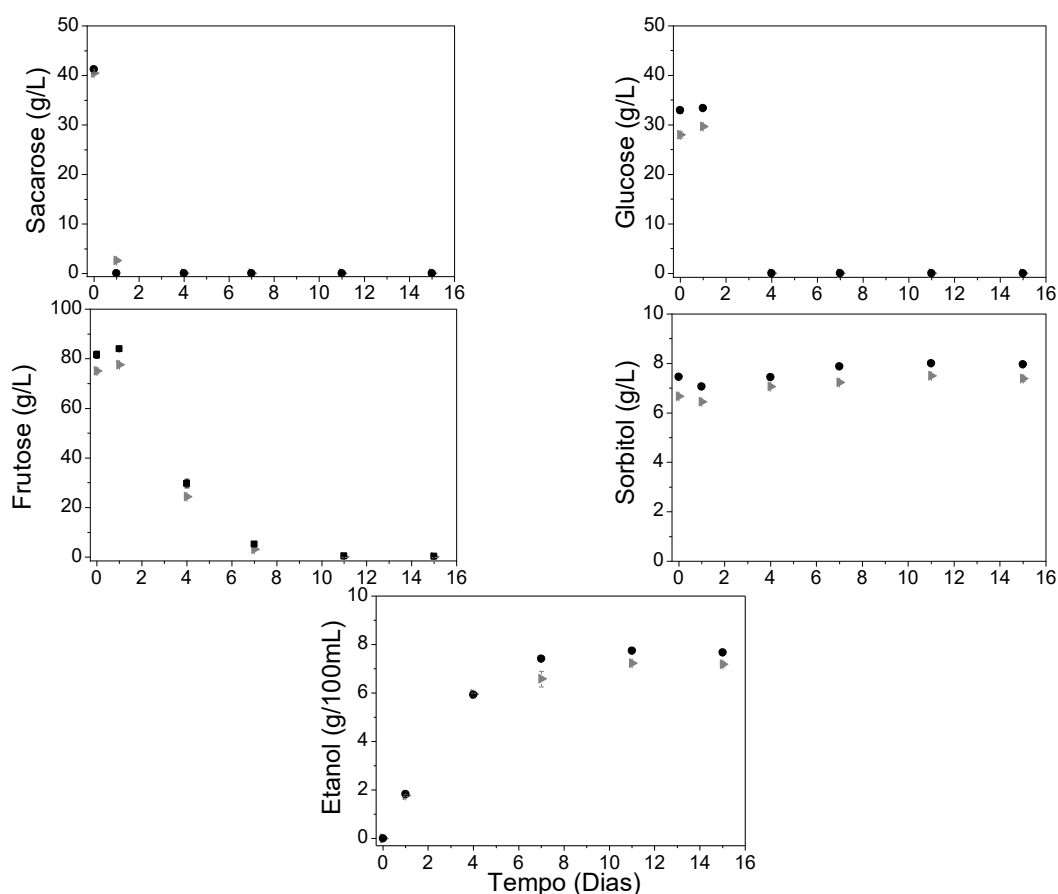


Figura 3.4 - Teores de açúcares (sacarose, glucose e frutose), etanol e sorbitol durante os dias da fermentação com e sem adição de extrato fenólico. Nota: \blacktriangleright - Sidra I (sem adição de extrato), \bullet - Sidra II (com adição de extrato); abc: letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os dias da fermentação das sidras I e II.

Os teores de sorbitol foram 6,66 e 7,45 (g/L) nos mostos I e II, respectivamente. No entanto, a fermentação resultou em teores de 7,38 e 7,96 (g/L) no 15º dia. Esse composto, poliálcool com poder edulcorante presente em algumas frutas, pode ser formado durante a fermentação por meio da redução de açúcares como a glucose e frutose (FEDOR; MILLAR; ACCOLA, 1960). O decréscimo da concentração de sorbitol no primeiro dia de fermentação possivelmente pode ter ocorrido por meio da ação da sorbitol dehidrogenase, uma vez que esta enzima pode converter esse composto em frutose (GOMIS et al., 1988). Ambas as concentrações detectadas no presente trabalho encontram-se dentro do intervalo verificado por Madrera, Lobo e Alonso (2010), entre 6,08 e 8,04 (g/L), os quais avaliaram quinze sidras experimentais em diferentes níveis de maturação.

A adição do extrato não alterou o pH do mosto. Entretanto, durante o período de fermentação, houve diferença entre os experimentos I e II no 7º e 11º dia, de acordo com o teste t. Além disso, foi observada variação significativa entre os dias da fermentação ($p < 0,05$), com valores entre 3,58 e 3,83. O pH ao final no 15º dia de fermentação, em ambos os experimentos, pode ser comparado à sidra elaborada a partir de maçãs industriais, pH de 3,8, de acordo com Madrera, Lobo e Alonso (2010).

Tabela 3.2 -Valores referentes ao pH e acidez durante o período de 15 dias de fermentação.

Dias	Sidra I		Sidra II	
	Ph	Acidez (g/100mL)	pH	Acidez (g/100mL)
0	3,79 ^a ± 0,01	0,27 ^e ± 0,01	3,80 ^b ± 0,01	0,28 ^e ± 0,01
1	3,63 ^c ± 0,01	0,28 ^d ± 0,01	3,63 ^e ± 0,01	0,28 ^d ± 0,01
4	3,68 ^b ± 0,01	0,39 ^c ± 0,01	3,71 ^c ± 0,01	0,40 ^c ± 0,01
7	3,62 ^c ± 0,01	0,40 ^{ab} ± 0,01	3,66 ^d ± 0,01	0,42 ^a ± 0,01
11	3,58 ^d ± 0,01	0,40 ^a ± 0,01	3,71 ^c ± 0,01	0,41 ^{ab} ± 0,01
15	3,80 ^a ± 0,01	0,40 ^{bc} ± 0,01	3,83 ^a ± 0,01	0,41 ^b ± 0,01

Nota: Sidra I: sem adição de extrato, sidra II: com adição de extrato, ^{abc}: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os dias de fermentação, $p < 0,05$, segundo teste t.

Em relação aos teores de acidez total titulável (Tabela 3.3), ambos os experimentos apresentaram teores considerados baixos ($< 0,45$ g/100mL), característicos de sucos obtidos a partir de maçãs destinadas ao consumo *in natura* (PAGANINI et al., 2004). Essa concentração variou significativamente ($p < 0,05$) durante o período de fermentação. Os experimentos I e II mostraram-se semelhantes no decorrer desse período, aumentando a concentração com o passar

dos dias até o sétimo dia, quando se mantiveram constantes. A partir do 4º dia de fermentação, os teores começaram a apresentar diferença significativa ($p < 0,05$) entre os experimentos. Entretanto, o aumento observado foi de apenas 0,01 g/100mL no teor da sidra II em relação a I. Cabe ressaltar que os teores de acidez total das sidras encontra-se dentro do limite definido pela legislação brasileira, 0,3 a 0,8 g/100mL (BRASIL, 2008).

3.3.2 Composição fenólica e atividade antioxidante

De acordo com a Tabela 3.4, o mosto com adição de extrato obtido a partir do bagaço da maçã apresentou aumento de 22,99% na composição fenólica total, aproximadamente 40% no teor flavonoides totais e um valor médio de 41,87% na atividade antioxidante. A concentração de fenóis totais e suas classes foram reduzidas durante a fermentação tanto na sidra I quanto na sidra II, uma vez que esses compostos passam por alterações devido a reações oxidativas, esterificação e hidrólises, no decorrer do processo fermentativo (YE; YUE; YUAN, 2014). Tal resultado está de acordo com Alberti et al. (2016), os quais verificaram que, em geral, a sidra apresenta menor concentração fenólica e menor atividade antioxidante que o mosto. Além disso, verificaram que a cultivar Fuji Suprema apresenta menores teores em comparação às cultivares Gala e Lis Gala. Entretanto, o mosto sem a adição de extrato obtido no presente estudo apresentou teores mais elevados de fenóis totais (406,89 mg/L) em comparação a maior concentração detectada na cultivar Fuji Suprema (279 mg/L).

Em relação à concentração de flavonoides totais, a sidra I, ao final dos 15 dias de fermentação, apresentou concentração de 57,03 mg/L, próximo ao teor mínimo detectado por Alberti et al. (2016) em sidra elaborada com maçã Fuji Suprema, 63 mg/L. No entanto, a sidra II apresentou maiores concentrações de compostos pertencentes à essa classe fenólica em todo processo fermentativo e, ao final dos 15 dias, apresentou teor 56,54% mais elevado que a sidra I. A adição do extrato permitiu ainda que o teor de flavanóis no 4º dia de fermentação fosse equivalente ao teor encontrado no dia 0 (mosto) do tratamento I, sem adição. A sidra II apresentou maiores teores de flavonóis totais durante todo processo fermentativo.

Tabela 3.3 - Compostos fenólicos e atividade antioxidante durante a fermentação do mosto de maçã com e sem adição de extrato.

Dias	Amostras	CFT (mg EAC/L)	FT (mg ECAT/L)	FA (mg ECAT/L)	FO (mg ERU/L)	DPPH (μ mol TE/L)	FRAP (μ mol TE/L)	ABTS (μ mol TE/L)	CUPRAC (μ mol TE/L)
0	Mosto I	406,89 ^c \pm 9,86	107,17 ^b \pm 1,28	90,33 ^c \pm 1,15	0,90 ⁱ \pm 0,01	466,6 ^{bc} \pm 38,5	1160,76 ^f \pm 18,29	718,90 ^e \pm 9,48	3298,78 ^{abcd} \pm 163,58
	Mosto II	500,44 ^a \pm 6,72	148,90 ^a \pm 0,63	111,00 ^a \pm 1,10	6,60 ^f \pm 0,01	802,6 ^a \pm 79,5	1336,11 ^d \pm 24,06	979,13 ^c \pm 27,39	3421,00 ^{ab} \pm 57,74
1	Sidra I	373,56 ^d \pm 11,11	69,13 ^f \pm 0,74	59,33 ^d \pm 1,37	1,07 ^h \pm 0,01	541,56 ^{bc} \pm 56,66	1207,64 ^f \pm 38,51	605,1 ^f \pm 14,7	3107,11 ^{de} \pm 388,07
	Sidra II	457,97 ^b \pm 8,35	96,46 ^c \pm 1,32	97,0 ^b \pm 1,1	13,36 ^a \pm 0,01	791,50 ^a \pm 55,24	1417,3 ^c \pm 14,4	927,51 ^{cd} \pm 74,89	3132,11 ^{bcd} \pm 138,51
4	Sidra I	343,9 ^e \pm 9,6	55,8 ^g \pm 1,1	58,00 ^{ef} \pm 0,89	1,12 ^g \pm 0,01	558,16 ^b \pm 53,59	1183,33 ^f \pm 38,13	649,7 ^f \pm 19,3	3162,67 ^{cde} \pm 150,09
	Sidra II	421,41 ^c \pm 12,40	86,44 ^e \pm 0,63	91,75 ^c \pm 1,17	12,00 ^b \pm 0,08	820,61 ^a \pm 49,46	1439,8 ^{bc} \pm 40,2	918,0 ^d \pm 20,3	3379,33 ^{ab} \pm 185,52
7	Sidra I	295,60 ^h \pm 7,75	54,72 ^{fg} \pm 1,04	57,83 ^e \pm 1,47	1,05 ^h \pm 0,01	489,87 ^{bc} \pm 65,18	1171,18 ^f \pm 58,53	640,6 ^f \pm 10,4	2734,89 ^{de} \pm 214,84
	Sidra II	373,56 ^d \pm 6,01	89,95 ^d \pm 1,84	90 ^c \pm 1	11,26 ^c \pm 0,04	777,56 ^a \pm 42,74	1482,81 ^b \pm 38,94	972,81 ^c \pm 42,14	3429,3 ^a \pm 448,3
11	Sidra I	316,57 ^g \pm 16,66	60,25 ^f \pm 1,91	56,17 ^{fg} \pm 0,75	1,04 ^h \pm 0,01	483,80 ^{bc} \pm 116,71	1262,33 ^e \pm 77,49	643,16 ^f \pm 26,54	2984,89 ^e \pm 205,59
	Sidra II	337,54 ^{ef} \pm 6,58	91,42 ^d \pm 1,12	90,25 ^c \pm 0,76	8,29 ^d \pm 0,02	761,77 ^a \pm 39,49	1656,42 ^a \pm 48,68	1154,0 ^a \pm 84,7	3532,11 ^a \pm 456,15
15	Sidra I	298,83 ^h \pm 23,03	57,03 ^{fg} \pm 1,56	55,75 ^g \pm 0,76	1,07 ^h \pm 0,01	479,0 ^c \pm 86,8	1183,77 ^f \pm 63,84	630,6 ^f \pm 24,1	2890,44 ^e \pm 221,21
	Sidra II	327,32 ^{fg} \pm 7,36	89,3 ^d \pm 0,5	90,50 ^c \pm 0,45	7,71 ^e \pm 0,02	758,4 ^a \pm 57,6	1445,49 ^{bc} \pm 29,77	1057,79 ^b \pm 28,88	3302,9 ^{abc} \pm 276,1

Nota: I: sidra sem adição de extrato, II: sidra com adição de extrato, CFT: compostos fenólicos totais, FT: flavonoides totais, FA: flavanóis, FO: flavonóis. ^{abc}: diferença significativa entre amostras na mesma coluna, $p < 0,05$.

Com relação aos teores dos compostos fenólicos individuais determinados por CLAE (Figura 3.5), pode ser observado que a adição do extrato não aumentou significativamente ($p > 0,05$) a concentração de ácido clorogênico, a qual apresentou teores de 15,14 mg/L no mosto I e 16,27 mg/L no mosto II. Durante a fermentação, houve diminuição nos dois experimentos, resultando em uma concentração final de 4,52 e 6,40 mg/L nas sidras I e II, respectivamente. Tal variação provavelmente ocorreu devido a reações de hidrólise, formando os ácidos quínico e cafeico durante o processo fermentativo (GONTHIER et al., 2003; MADRERA; LOBO; VALLES, 2006). Dessa forma, o ácido cafeico, um ácido cinâmico livre, aumentou durante a fermentação, assim como relatado por Mangas et al. (1997). Os tratamentos I e II apresentaram concentrações semelhantes, havendo diferença significativa ($p \leq 0,05$) apenas no sétimo dia de fermentação.

O ácido cumárico apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) durante o processo fermentativo, exceto no primeiro dia de fermentação, quando os teores referentes às sidras I e II se igualaram. No início da fermentação, observa-se um aumento nos teores desse ácido, o qual, provavelmente, foi liberado juntamente com o ácido quínico durante o processo fermentativo devido a hidrólise do ácido *p*-cumaroilquínico, de acordo com Madrera, Lobo e Valles (2006). O ácido *p*-cumaroilquínico não foi avaliado no presente estudo, no entanto, as sidras, em geral, apresentam quantidades significativas deste composto (MADRERA; LOBO; VALLES, 2006; MARKS; MULLEN; CROZIER, 2007; ZURIARRAIN et al., 2014; LAAKSONEN et al., 2017).

A partir do sétimo dia de fermentação, houve um decréscimo significativo nos teores de ácido cumárico, provavelmente, devido à adsorção pelas leveduras durante o período fermentativo e atuação na formação de outros polifenóis (flavonoides como flavonas e flavonóis) por meio de reações de esterificação em presença de etanol (SAMALEH et al., 2008). Além disso, a presença de outros ácidos hidroxicinâmicos, especialmente o ácido cafeico, induz a síntese da descarboxilase e redutase, estimulando o consumo do ácido *p*-cumárico, o qual pode ser precursor de alguns compostos aromáticos (SAMALEH et al., 2008; SILVA et al., 2011; YE; YUE; YUAN, 2014). Os teores finais foram de 1,78 e 1,96 mg/L, respectivamente para as sidras I e II.

A adição do extrato proporcionou aumento de 58,64% sobre a concentração de floridzina no mosto, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre as sidras

I e II. Em ambos os experimentos, a concentração desse composto aumentou durante o processo fermentativo. No final da fermentação o teor na sidra II foi de 13,33 mg/L e 7,81 mg/L na sidra I. A concentração abundante desse flavonoide pertencente à subclasse dihidrochalcona pode ser interessante uma vez que esse composto pode diminuir a glicemia e bloquear a absorção da glucose, podendo ser associada ao tratamento de diabetes tipo 2, hiperglicemia e perda de peso (EHRENKRANZ et al., 2005; MASUMOTO et al., 2009).

A sidra II apresentou teores de glicosídeos de quercetina, os quais são praticamente inexistentes na sidra I. Esses compostos são flavonoides pertencentes à subclasse dos flavonóis, encontrados quase exclusivamente no epicarpo da maçã (KARAMAN et al., 2012). O somatório de todos os glicosídeos de quercetina detectados foi de 0,90 mg/L para o mosto I, valor pouco inferior ao detectado por Laaksonen et al. (2017), 1,2 mg/L. A adição de extrato resultou em teor de 6,60 mg/L no mosto II, um aumento de 83%. Durante a fermentação, houve aumento no teor desses flavonoides, resultando em teores de 1,07 e 7,70 mg/L para sidras I e II, respectivamente. Laaksonen et al. (2017), também verificaram aumento significativo nos teores de glicosídeos de quercetina durante o processo fermentativo. Segundo Binpilas et al. (2015), as variações dos glicosídeos de quercetina durante a fermentação pode ocorrer devido a reações de hidrólise catalisadas por enzimas tais como a β -glucosidase, a qual pode ser liberada por algumas leveduras *S. cerevisiae*.

Dessa forma, a adição do extrato permitiu a aproximação da concentração dos teores de floridzina e glicosídeos de quercetina detectados em sidras naturais elaboradas a partir da mistura de mostos de variedades de maçãs industriais, as quais apresentaram em torno de 14,85 mg/L de floridzina e teor máximo de 11,53 mg/L de glicosídeos de quercetina (MADRERA; LOBO; VALLES, 2006).

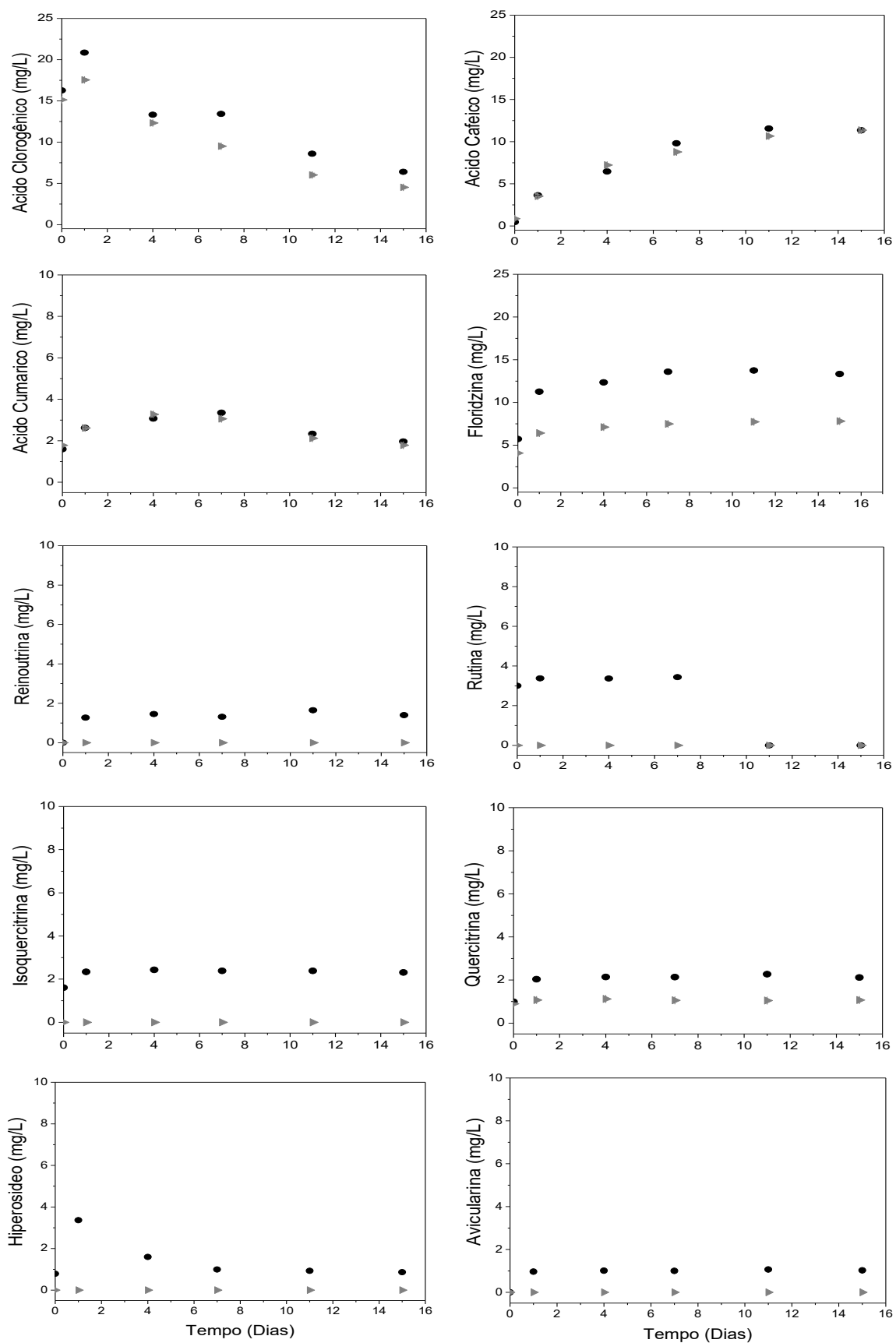


Figura 3.5 - Efeito da fermentação com e sem adição de extrato sobre os teores de compostos fenólicos. Nota: ► - Sidra I (sem adição de extrato), ● - Sidra II (com adição de extrato).

Considerando os teores médios de todos os compostos fenólicos individuais detectados, no final da fermentação, a adição resultou em aumento de 35%. Cabe ainda ressaltar que a adição do extrato resultou em um aumento na concentração final de compostos pertencentes à classe dos flavonoides de 2,4 vezes.

O aumento da atividade antioxidante nos teores finais da sidra II em relação à sidra I, determinada pelos diferentes métodos utilizados, variou entre 14,27 e 67,61%. Essa variação ocorre devido às diferenças entre os princípios dos métodos. Enquanto FRAP e CUPRAC quantificam o poder de redução, nos quais o antioxidante atua por meio da transferência de elétrons não competitivos (ET), os métodos de DPPH e ABTS levam em conta tanto a ET como a transferência de átomo de hidrogênio (HAT) para que ocorra a captura do radical (BARTOSZ, 2010; APAK et al., 2016a e b). Portanto, esses últimos dois métodos apresentaram maiores diferenças entre as sidras I e II.

Zuriarrain et al. (2014) avaliaram sidras elaboradas a partir de seis diferentes cultivares de maçãs industriais espanholas e verificaram que a atividade antioxidante nos mostos, determinada pelo método de FRAP apresentou teores entre 1560 e 9800 $\mu\text{mol TE/L}$. As sidras, no final da fermentação, apresentaram teores de 1171,18 a 1658,42 $\mu\text{mol TE/L}$. Como esperado, tanto os mostos quanto as sidras do presente trabalho apresentaram menor atividade antioxidante que as maçãs industriais. No entanto, o experimento com adição de extrato apresentou maior atividade antioxidante, aproximando-se dos teores mínimos determinados por esses autores, referentes a cultivar Manttoni.

O teor de flavonoides totais apresentaram correlações ($p < 0,05$) com a atividade antioxidante nos métodos utilizados nesse trabalho ($r > 0,63$), sendo que a maior correlação foi observada no método de captura do radical ABTS ($r = 0,82$). Portanto, a adição de flavonoides no início da fermentação resultou em aumento da atividade antioxidante da sidra II devido ao alto potencial redox (TSAO; YANG, 2005) e a estrutura da sua molécula, principalmente, pela presença da estrutura *o*-dihidroxi (catecol) no anel B, a qual tem se mostrado essencial para a efetividade da captura do radical (FIRUZI et al., 2005). Em relação aos compostos individuais determinados por cromatografia líquida, os glicosídeos de quercetina, presentes em maiores concentrações no bagaço (KARAMAN et al., 2012), apresentaram correlação significativa ($p < 0,05$) com a atividade antioxidante. A maior influência foi atribuída aos compostos isoquercitrina, reinoutrina e avicularina ($r_{\text{DPPH}} > 0,80$; $r_{\text{ABTS}} > 0,82$;

$r_{FRAP} > 0,89$ e $r_{CUPRAC} > 0,58$). Além disso, os compostos hiperosídeo e quercitrina correlacionaram-se ($p < 0,05$) com os métodos de DPPH, ABTS e FRAP ($r_{DPPH} = 0,7480$ e $0,7892$, $r_{ABTS} = 0,5880$ e $0,8091$, $r_{FRAP} = 0,5909$ e $0,9037$) e a rutina apresentou correlação com o método de DPPH ($r = 0,7419$, $p < 0,05$). Tais compostos apresentam além do grupo catecol no anel B, a ligação 2,3-ligação dupla conjugada com o grupo 4-oxo no anel heterocíclico e presença de duas hidroxilas no anel A, favorecendo a atividade antioxidante desses compostos.

3.3.3 Cor

Os parâmetros da análise colorimétrica, Tabela 3.5, indicam que, em geral, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos I e II em todos os parâmetros analisados, os quais também variaram no decorrer do período de fermentação. O mosto II apresentou menor luminosidade (L^*) em relação ao I, apresentando-se como uma bebida mais escura. Tal resultado pode ser atribuído, principalmente, à diferença na concentração e composição fenólica dos experimentos. Quanto maior a concentração fenólica, menor o valor de L^* , ou seja, mais escura a bebida (LE DEUN et al., 2015). Além disso, as reações enzimáticas, outro fator que influencia a luminosidade das bebidas, devem ser consideradas. Durante a etapa de trituração para o processamento da fruta, os compostos fenólicos presentes nos vacúolos celulares são expostos ao oxigênio após o rompimento do tecido celular. A sequência de reações oxidativas catalisadas pela enzima polifenoloxidase (PPO), gera o composto colorido *o*-quinona. Esse composto, por ser muito instável, pode envolver-se rapidamente em reações não enzimáticas formando compostos secundários, os quais podem ser incolores ou pigmentados (GOUPY et al., 1995; LE DEUN et al., 2015). Provavelmente, parte da composição fenólica do bagaço também passou por reações oxidativas durante as etapas do processo, a qual pode ter influenciado cor do mosto e da sidra com adição de extrato.

Com o início da fermentação, a luminosidade aumentou em ambos os experimentos, provavelmente, devido às alterações na composição da bebida durante a fermentação alcoólica (ALBERTI et al., 2016) e a adsorção de alguns compostos responsáveis pela pigmentação pela levedura (MORATA et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2008). No entanto, a diferença entre os experimentos I e II permaneceu significativa ($p < 0,05$) até o final dos 15 dias de fermentação.

Tabela 3.4 - Parâmetros da análise colorimétrica durante os dias de fermentação.

Dias	Amostras	L*	a*	b*	C	h°
0	I	83,05 ⁱ ± 0,02	6,05 ^b ± 0,04	61,18 ^b ± 0,01	61,47 ^b ± 0,04	84,35 ± 0,01 ^h
	II	81,56 ^j ± 0,18	6,84 ^a ± 0,12	64,08 ^a ± 0,26	64,44 ^a ± 0,27	83,90 ± 0,08 ⁱ
1	I	94,64 ^f ± 0,15	-4,51 ⁱ ± 0,02	33,84 ^d ± 0,06	34,14 ^d ± 0,07	97,58 ± 0,06 ^a
	II	92,83 ^h ± 0,30	-3,55 ⁱ ± 0,09	38,56 ^c ± 0,44	38,72 ^c ± 0,40	95,26 ± 0,19 ^f
4	I	95,68 ^d ± 0,08	-2,71 ^h ± 0,01	22,55 ^f ± 0,04	22,71 ^f ± 0,04	96,87 ± 0,01 ^b
	II	94,97 ^g ± 0,10	-2,39 ^g ± 0,01	25,36 ^e ± 0,13	25,47 ^e ± 0,13	95,38 ± 5,94 ^e
7	I	96,18 ^b ± 0,16	-2,12 ^f ± 0,03	18,59 ⁱ ± 0,47	18,71 ⁱ ± 0,47	96,52 ± 0,06 ^c
	II	95,23 ^e ± 0,18	-2,11 ^f ± 0,05	22,68 ^f ± 0,01	22,78 ^f ± 0,14	95,31 ± 6,28 ^{ef}
11	I	96,57 ^a ± 0,02	-1,95 ^e ± 0,01	17,89 ^j ± 0,18	18,00 ^j ± 0,18	96,20 ± 0,11 ^d
	II	95,84 ^d ± 0,24	-1,89 ^d ± 0,01	20,95 ^g ± 0,14	21,03 ^g ± 0,17	95,15 ± 5,92 ^g
15	I	96,53 ^a ± 0,11	-1,83 ^c ± 0,01	16,89 ^k ± 2,90	16,99 ^k ± 0,17	96,18 ± 0,06 ^d
	II	94,79 ^c ± 3,71	-1,82 ^c ± 0,06	19,85 ^h ± 0,05	19,93 ^h ± 0,04	95,24 ± 4,68 ^f

Nota: I: sidra sem adição de extrato, II: sidra com adição de extrato, L*: luminosidade, a*: cromaticidade vermelho/verde, b*: cromaticidade amarelo/azul, C: croma - intensidade, h°: ângulo *hue* - tonalidade. ^{abc}: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

Os valores referentes ao parâmetro a^* , relacionado à variação de vermelho a verde, indicam que a coloração das sidras foi alterada com o início da fermentação, passando de vermelha a esverdeada. Os resultados referentes ao parâmetro b^* indicam que ambos os mostos apresentaram coloração amarela, sendo que o mosto II é significativamente mais amarelo ($p < 0,05$), provavelmente, devido a maior concentração de flavonoides, principal classe de compostos extraídos do bagaço, os quais apresentam essa coloração (MALEC et al., 2014). Além disso, os compostos pertencentes à classe dihidrochalcona podem ser precursores de alguns compostos de oxidação com coloração amarela, identificados como derivados de floretina xiloglucosídeo (LE DEUN et al., 2015). Durante a fermentação, os valores desse parâmetro diminuíram, sempre havendo diferenças entre os experimentos I e II.

De acordo com o parâmetro *Croma* (C), o mosto II apresenta maior intensidade de cor, com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao I. Os valores diminuíram com o início da fermentação, entretanto, o tratamento II apresentou maior intensidade de cor durante todo o processo fermentativo. Os valores do

ângulo *hue* (h°) indicam que ambas as amostras apresentaram valores próximos a 90° , o qual representa a tonalidade amarela. Com o início da fermentação, a tonalidade foi alterada, passando de amarelo alaranjado para amarelo esverdeado, uma vez que a partir do primeiro dia de fermentação atingiram valores maiores que 90° . De acordo com Guyot et al. (2007), os produtos da oxidação da floridzina, por exemplo, apresentam coloração entre amarelo brilhante e laranja, conforme o aumento do pH do meio. Os compostos pertencentes a essa subclasse podem atuar juntamente com compostos como ácido clorogênico e a catequina no desenvolvimento da cor do suco e da sidra (LE GUERNEVÉ et al., 2004).

Contudo, a reincorporação dos compostos fenólicos retidos no bagaço da maçã pode influenciar a aparência do produto final, uma vez que alterou a cor dos mostos e das sidras. A cor pode ser considerada um importante parâmetro sensorial para a indústria de alimentos, a qual pode definir a qualidade e ser responsável primeira impressão do produto, interferindo diretamente na aceitabilidade e consumo de alimentos e bebidas (LE DEUN et al., 2015).

3.3.4 Avaliação sensorial

Os resultados da avaliação dos atributos sensoriais para cada julgador foram submetidos à Análise dos Componentes Principais (ACP), a fim de estabelecer relações entre as sidras I e II e os atributos sensoriais avaliados (DEL CAMPO et al., 2006; MADRERA; LOBO; ALONSO, 2010). A matriz de dados foi construída com quatro variáveis e dezesseis objetos, sendo as variáveis os atributos sensoriais amargor, adstringência, acidez e cor, e os objetos, as avaliações das sidras I e II pelos oito julgadores. Dois componentes principais foram projetados, os quais, juntos, explicaram 88,47% dos dados. O componente 1 explicou a maior parte dos resultados, 78,24%, apresentando correlação negativa em todos os atributos avaliados, exceto para a acidez ($r_{\text{adstringência}} = -0,914$, $r_{\text{amargor}} = -0,910$, $r_{\text{cor}} = -0,887$, $r_{\text{acidez}} = 0,82$).

A ACP sugeriu a formação de dois grupos, indicando que houve diferença entre as sidras I e II. O grupo 1, compreende os dados da avaliação da sidra II, com adição de extrato, a qual apresenta maior intensidade de cor, amargor e adstringência. Ao passo que os resultados referentes à sidra I, sem adição, pertencem ao segundo grupo, apresentando maior percepção de acidez (Figura 3.6).

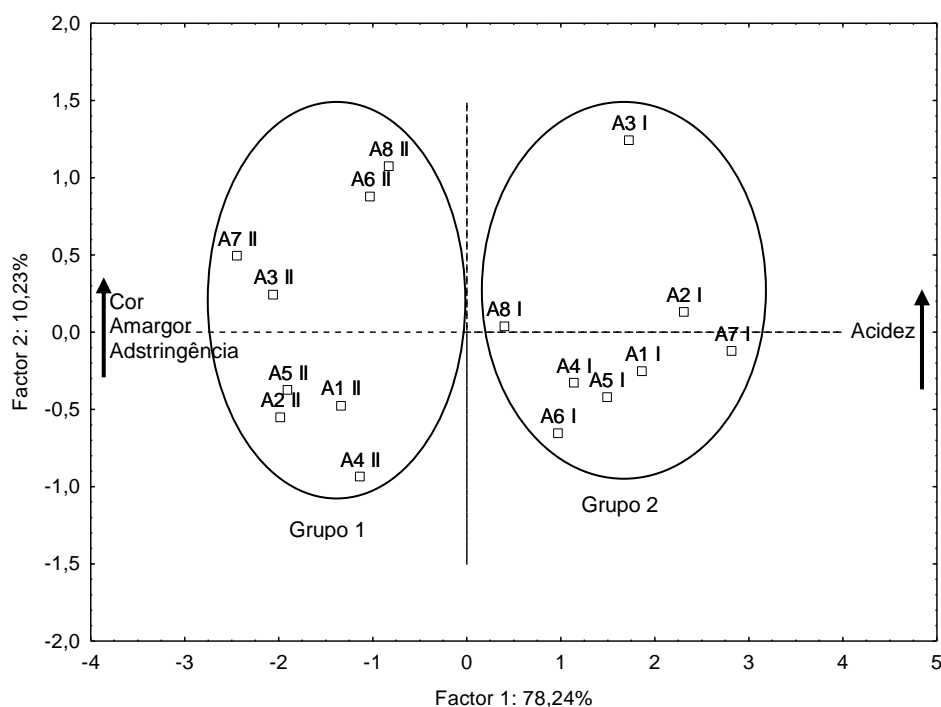


Figura 3.6 - Projeção da avaliação dos atributos sensoriais formada pelos componentes 1 e 2. Nota: A1 I a A8 I: avaliação da sidra sem adição de cada julgador e A1 II a A8 II: avaliação da sidra com adição de cada julgador.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as sidras sem e com adição de extrato para todos os atributos sensoriais avaliados, de acordo com o teste t. O gráfico radar (Figura 3.7) indica que a adição do extrato fenólico apresenta influência sobre todos os atributos avaliados, aumentando a intensidade da cor, amargor e adstringência, devido às influências que esses compostos exercem durante o processo fermentativo do mosto de maçã. Guyot et al. (1998) sugeriram que variedades de maçãs ricas em polifenóis apresentam maior aptidão para produção de sidras.

O resultado da avaliação da cor esteve de acordo com a análise colorimétrica, ressaltando que o aumento no conteúdo fenólico aumenta a intensidade de cor. O impacto dos polifenóis na percepção do amargor, acidez e adstringência tem sido observado em outros estudos, bem como sua correlação com o teor de etanol (DEL CAMPO et al., 2008; MADRERA; LOBO; ALONSO, 2010; SYMONEAUX et al., 2014; SYMONEAUX et al., 2015). Hunfnagel e Hofmann (2008) realizaram o teste sensorial *threshold* a fim de determinar os limites mínimos e máximos em diferentes classes fenólicas para a percepção de amargor e adstringência em vinho. Os flavonoides foram identificados como a classe que apresentou maior influência. A subclasse dos flavanóis foi apresentada como

responsável pelo amargor do produto final. Os glicosídeos de quercetina apresentaram os menores limites inferiores para a percepção de adstringência, sendo, portanto, a principal classe correlacionada com esse atributo, desempenhando papel fundamental na qualidade sensorial das sidras (LAAKSONEN et al., 2017). Além disso, a percepção da adstringência pode também estar relacionada ao pH da sidra (SYMONEAUX et al., 2015). Entretanto, no presente estudo, a diferença na concentração fenólica entre sidras I e II foi mais significativa que as diferenças no pH e teor alcoólico, portanto, sugere-se que a adição do extrato fenólico foi o principal fator responsável pelas alterações das características sensoriais da sidra II.

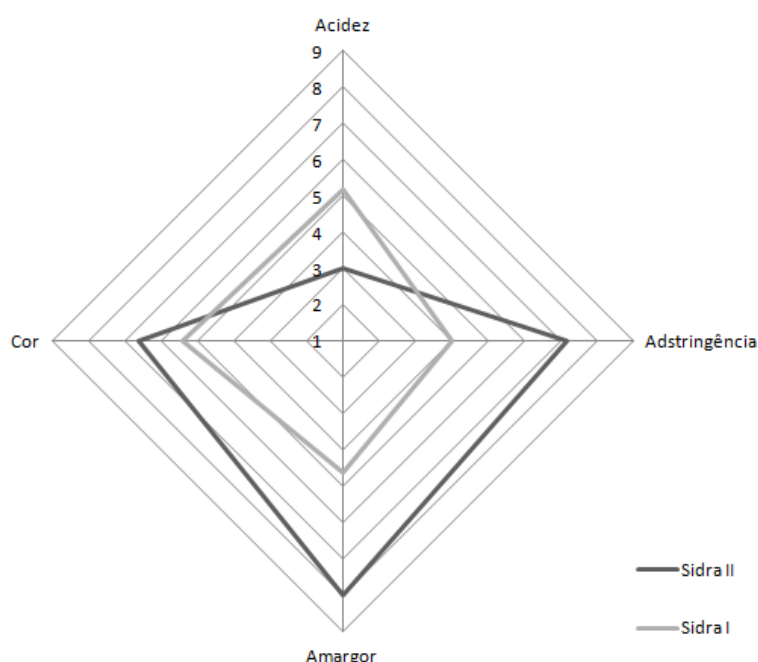


Figura 3.7 - Gráfico radar mostrando as diferenças sensoriais das sidras I e II.

Em relação ao atributo acidez, pode ser observado que a maior intensidade foi percebida na sidra I, sem adição de extrato. Simoneaux et al., (2015) não verificaram efeito significativo entre o teor fenólico e a percepção desse atributo. Dessa forma, a maior percepção de acidez na sidra I pode ser atribuída à alta percepção de amargor e adstringência na sidra II, o que pode ter mascarado a acidez.

Os resultados da análise sensorial referente à qualidade do odor indicaram que ambas as sidras foram aceitas pelos julgadores, com nota média de 6,50 para sidra I e 6,64 para a II, correspondendo ao intervalo entre gostei ligeiramente e

gostei moderadamente. De acordo com o teste t, não houve diferença significativa entre as duas amostras ($p > 0,05$). Portanto, a concentração fenólica adicionada por meio do extrato não apresentou efeitos sobre a formação de aromas durante o processo fermentativo. Esse resultado é satisfatório uma vez que, de acordo com Buron et al. (2011), alguns fenóis voláteis podem prejudicar a qualidade do aroma de bebidas fermentadas de fruta uma vez que podem estar relacionados com a perda de notas aromáticas frutadas. A conversão dos compostos fenólicos em fenóis voláteis pode ocorrer por meio da atividade sequencial de duas enzimas, cinamato descarboxilase e vinilfenol redutase, as quais podem ser liberadas por algumas leveduras do gênero *Saccharomyces*. (CHATONET et al., 1992)

Portanto, apesar das prováveis alterações ocorridas durante a formação do perfil aromático das sidras devido à adição do extrato fenólico, a qualidade e aceitabilidade do odor da bebida não foram prejudicadas.

3.4 CONCLUSÃO

A adição do extrato fenólico obtido a partir do bagaço de maçã resultou em aumento de aproximadamente 40% no teor de flavonoides totais e um valor máximo de 41% na atividade antioxidante nos mostos, sem prejudicar o processo fermentativo. Durante a fermentação houve variação nos teores dos compostos fenólicos individuais determinados por CLAE. No final do processo, a adição do extrato resultou em aumento de 35% no teor desses compostos, permitindo a reincorporação dos compostos retidos no bagaço durante o processamento, uma vez que a sidra II apresentou compostos presentes apenas no epicarpo da maçã. Além disso, a composição da sidra II pode ser comparada a sidras elaboradas com variedades de maçãs industriais quanto à concentração de floridzina e glicosídeos de quercetina. Conseqüentemente, a adição aumentou a capacidade antioxidante da sidra, sendo a classe dos flavonoides a principal relacionada com esse aumento. A adição do extrato fenólico influenciou características sensoriais importantes para a determinação da qualidade e aceitabilidade da bebida, aumentando a intensidade da cor e dos sabores amargo e adstringente no produto final, sem prejudicar a qualidade do odor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato fenólico do bagaço da maçã utilizando etanol como solvente em condições otimizadas pelo método de superfície de resposta (MSR) se mostrou eficaz na recuperação dos compostos retidos no subproduto do processamento dessa fruta. A maioria dos compostos detectados no extrato pertence à classe de flavonoides. Dentre os fenóis monoméricos, os glicosídeos de quercetina, compostos presentes quase exclusivamente no epicarpo da fruta, foram os principais detectados. Dessa forma, o extrato pode ser utilizado pela indústria de bebidas a fim de reincorporar esses compostos bioativos.

A avaliação da estabilidade durante o período de armazenamento em diferentes pH's e temperaturas sugeriu que o extrato armazenamento ou incorporado em alimentos e bebidas que apresentam baixo pH e armazenados em temperatura de refrigeração podem apresentar menor degradação dos compostos. Entretanto, para melhor compreensão da estabilidade do extrato durante o período de armazenamento e aplicação, novos testes devem ser realizados utilizando maiores temperaturas e determinando os fenóis individualmente.

A incorporação do extrato fenólico no mosto antes do início da fermentação foi eficaz na reincorporação de parte da composição fenólica retida no bagaço durante o processamento da fruta, aproximando ao teor fenólico das sidras obtidas a partir de maçãs industriais. Além disso, a adição do extrato resultou em aumento na atividade antioxidante. As diferenças na composição fenólica das sidras elaboradas com adição do extrato implicaram em diferenças nas percepções dos atributos sensoriais, aumentando a intensidade da cor, amargor e adstringência. Apesar das alterações ocorridas, a qualidade e aceitabilidade do odor não foram prejudicadas.

Desta forma, essa pesquisa pode impactar o setor de processamento das bebidas derivadas da maçã. Além disso, pode despertar interesse em outros setores da indústria de alimentos que buscam o desenvolvimento de produtos com apelo funcional devido à atividade antioxidante, a qual também pode conferir benefícios tecnológicos, aumentando a vida útil dos produtos.

REFERÊNCIAS

- ABPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. **Brazilian Apple Yearbook**, 2016. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: 06 dez. 2017.
- AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* – Liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1071-1080, 2011.
- ALBERTI, A., SANTOS, T. P. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; SANTOS, C. M. E.; BRAGA, C. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A. Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 436-443, 2016.
- ALBERTI, A.; BRAGA, C. M.; JASTER, H.; NOGUEIRA, A. Dissolved oxygen in apple must: technological implications in cider processing. **Journal of the Institute Brewing e Distilling**, v. 120, p. 65-70, 2014a.
- ALBERTI, A.; VIEIRA, R. G.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 551-558, 2011.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; COUTO, M.; JUDACEWSKI, P.; MAFRA, L. I.; NOGUEIRA, A. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1511-1518, 2017.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimization of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-158, 2014b.
- AL-FARSI, M. A.; LEE, C. Y. Optimization of phenolic and dietary fiber extraction from date seeds. **Food Chemistry**, v. 108, p. 977-985, 2008.
- AMEMDOLA, D.; DE FEVERI, D. M.; SPIGNO, G. Grape marc phenolic: extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 384-392, 2010.
- ÁNGEL, M. H.; GONZÁLEZ, E, A. P. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v.18, n.1, p. 12-14,1999.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p.1-9, 2006.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 20 Ed. Gaithersburg, MD, 2016.

APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇAPANOĞLU, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 997-1027, 2016a.

APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇAPANOĞLU, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 1028-1045, 2016b.

APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇELİK, S. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity assay). **Microchimica Acta**, v. 160, p. 413-419, 2008.

ARON, P. M.; KENNEDY, J. A.; Flavan-3-ol: nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 1, p. 79-104, 2008.

BAI, X.; YUE, T. L.; YUAN, Y. H.; ZHANG, H. W. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, 3751–3758, 2010.

BAI, X.; ZHANG, H. W.; REN, S. Antioxidant activity and HPLC analyses of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace. **Journal of Science and Food Technology**, v.93 p. 2502-2506, 2013.

BARTOSZ, G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. **Free Radical Research**, v. 44, n. 7, p.711-720, 2010.

BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836-845, 2007.

BEHELIN, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

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.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. Evaluation of chemical stability of St John’s wort commercial extract and some preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, p. 199-208, 2001.

BILLAUD, C.; BRUM-MÉRIMÉE, S.; LOUARME, L.; NICOLAS, J. Effect of glutathione and Maillard reaction products prepared from glucose or fructose with glutathione on polyphenoloxidase from apple - I: Enzymatic browning and enzyme activity inhibition. **Food Chemistry**, v. 84, p. 223-233, 2004.

BIMPILAS, A.; TSIMOGIANNIS, G.; BALTA-BROUMA, K. LYMPEROPOULOU, T.; OREOPOULOU, V. Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. **Food Chemistry**, v. 178, p. 164-171, 2015.

BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by eritrosine B. staining. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p. 225-230, 1991.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455-475, 1960.

BOYER, J.; LIU, R. H. Apple Phytochemicals and Their Health Benefits. **Nutrition Journal**, v. 3, p. 1-15, 2004.

BRAGA, C. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; SILVA, K. M.; SOUZA, F. K. F.; PIETROWSKI, G. A. M.; COUTO, M.; GRANATO, D.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Classification of juices and fermented beverages made from unripe, ripe and senescent apples based on the aromatic profile using chemometrics. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 967-974, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 22, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Inter setorial de Bebidas e dá outras providências. Diário oficial (da) República Federativa do Brasil. Brasília, 1994. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 27 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008. Aprova os regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas: fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê. Diário oficial (da) República Federativa do Brasil. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 21 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE POLÍTICA AGRÍCOLA. Departamento de Comercialização e Abastecimento Agrícola e Pecuário. Coordenação-Geral para Pecuária e Culturas. INFORMATIVO Nº 54 MAR. 2013. CENÁRIO DA CADEIA PRODUTIVA DA MAÇÃ. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 23 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário oficial (da) República Federativa do Brasil. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988. Diário oficial (da) República Federativa do Brasil. Brasília, 1988. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 01 abr. 2016.

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

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 788-794, 1978.

BRUNS, R. E.; SCARMINO, I. S.; BARROS NETO, B. **Statistical desing – chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, p. 273, 2006.

BUCIC-KOJIC, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIC, M.; VELIC, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 263-242, 2007.

BURON, N.; COTON, M.; DESMARAIS, C.; LEDAUPHIN, J.; GUICHARD, H.; BARILLIER, D.; COTON, E. Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1243-1251, 2011.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Massa transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379-389, 2003.

CAM, M.; AABY, K. Optimization of extraction of apple pomace phenolics with water by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9103-9111, 2010.

CALLAO, M. P. Multivariate experimental design in environmental analysis. **Trends and Analytical Chemistry**, v. 62, p. 86-92, 2014.

CARBONE, K.; GIANNINI, B.; PICCHI, V.; LO SCALZO, R.; CECCHINI, F. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 493-500, 2011.

CARRANZA, P. H.; SOSA, R. A.; BETHÁN, J. A. G.; CRUZ, A. R. N.; JIMÉNIS, E. C.; VELASCO, C. E. O. Optimization of antioxidant compounds extraction from fruit by-products: apple pomace, orange and banana peel. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, p. 103-115, 2016.

CARVALHO, J R. F.; SILVA, K. M.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G; NOGUEIRA, A. Elaboração de fermentado frisante de maçã com características semelhantes à sidra francesa. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 97-144, 2010.

CARVALHO, J. R.; SILVA, K. M.; BRAGA, C. M.; ALBERTI, A.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Efeito da clarificação com gelatina no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de fermentados de maçã. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, n. 1, p. 41-49, 2011.

CETKOVIC, G.; CANADANOVIC-BRUNET, J.; DJILAS, S.; SAVATOVIC, S.; MANDIC, A.; TUMBAS, V. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. **Food Chemistry**, v. 109, p. 340-347, 2008.

CHANDRASEKAR, V.; MANTIN-GONZÁLES, M. S. S.; HIRST, P.; BALLARD, T. S. Optimizing microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from Red Delicious and Jonathan apple pomace. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, p. 571-582, 2015.

CHATONNET, P. DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J. N.; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 60, p. 165-178, 1992.

CHEMAT, F.; RAMBAUT, N.; FABIANO-TIXIER, A. S.; PIERSON, J. T.; BILY, A. Green Extraction: From concepts to research, education, and economical opportunities. In: Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice. **Wiley-VCH Verlag GmbH e Co-KaA**. 1 Ed. Cap. 1, p. 1-30, 2015.

CHENG, Z.; REN, J.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 4067-4073, 2002.

COELHO, L.; WOSIACKI, G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 582-588, 2010.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardio protective effects and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CORRAL, J. L.; RAMOS, A. Q.; DÁVILA, A. C.; MORALES, J. J. Z.; PALAZUELOS, E. A.; GUETIÉRRES, M. G. R.; PIZARRO, C. O. M.; ANCHONDO, T. J. R. Polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace in an extruded cereal. **Food Science and Technology**, v. 65, p. 228-236, 2016.

COSTA, C.; TSATSAKIS, A.; MAMOULAKIS, C.; TEODORO, M.; BRIGUGLIO, G.; CARUSO, E.; TSOUKALAS, D.; MARGINA, D.; DARDIOTIS, E.; KOURETAS, D.; FENGA, C. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 286-299, 2017.

DE LUCA, V.; PIERRE, B. S. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trend Plant Science**, v. 5, p. 168-173, 2000.

DEL CAMPO, G.; BERREGI, I.; SANTOS, J. I.; DUEÑAS, M.; IRASTORZA, A. Development of alcoholic and malolactic fermentations in highly acid and phenolic apple musts. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2857-2863, 2008.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LOPÉZ, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins and betalains – Characteristics, biosynthesis, processing,

and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DERRINGER, G; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 2, p. 214-219, 1980.

DEVIC, E.; GUYOT, S.; DAUDIN, J. D.; BONAZZI, C. Kinetics of polyphenol losses during soaking and drying of cider apples. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 867-877, 2010.

DIXON, J.; HEWETT, E. W. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. **New Zeland Journal Crop Horticultural Science**, v. 28, p. 155-173, 2000.

DRILLEAU, J. F. Fermentation of cider. **Pomme à cidre**, v. 21, p. 20-22, 1990.

DRILLEAU, J. F. La Sidra. In: BOUGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. Microbiologia alimentaria. **Zaragoza: Editorial Acribia**, cap. 4, p. 112-123, 1995.

EHRENKRANS, J. R. L.; LEWIS, N. G.; KAHN, C. R.; ROTH, J. Phoridizin: A Review. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 21, n. 1, p. 31-38, 2005.

EMPRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Pera, maçã e caqui: o futuro da agricultura no nordeste. Portal Embrapa, 30 de maio de 2014. Disponível em: www.embrapa.br/busca-de-noticias/ Acesso em: 30 jan. 2018.

FAOSTAT (2017). FAO Statistical Database. Disponível em: <http://faostat.fao.org/> Acesso em: 27 dez. 2017.

FERRIS, S.; PIERGIOVANNI, L. Optimization of manufacture of almond paste cookies using response surface methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, p. 64-87, 2009.

FEDOR, W. S.; MILLAR, J.; ACCOLA, J. A. Sorbitol. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 282-286, 1960.

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

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, D. G.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, D. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 179-186, 2007.

FERRETTI, G.; TURCO, I.; BACCHETTI, T. Apple as a source of dietary phytonutrients: bioavailability and evidence of protective effects against human cardiovascular disease. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 1234-1246, 2014.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant power assay and cyclic voltammetry. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1721, p. 174-184, 2005.

GOMES, T. A.; FILHO, M. R. F.; ZIELINSKI, A. A. F.; PIETROWSKI, G. A. M.; NOGUEIRA, A. Microbial Levels in Apple Must and Their Association with Fruit Selection, Washing and Sanitization. **Journal of Food Safety**, v. 34, p. 141-149, 2014.

GOMIS, D. B.; ALVAREZ, M. D. G.; ALONSO, J. J. M.; VALLINA, A. M. Determination of sugars and alcohols in apple juice and cider by High Performance Liquid Chromatography. **Chromatographia: an International Journal for Rapid Communication in Chromatography, Electrophoresis and Associated Techniques**, v. 25, p. 701-706, 1988.

GONTHIER, M. P.; VERNY, M. A.; BESSON, C.; RÉMÉSY, C.; SCALBERTI, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **The Journal of Nutrition - American Society for Nutritional Science**, v. 133, n. 3, p. 1853-1859, 2003.

GOUPY, P.; AMIOT, M. J.; RICHARD-FORGET, F.; DUPRAT, F.; AUBERT, S.; NICOLAS, J. Enzymatic browning of model solutions and apple phenol extracts by apple polyphenoloxidase. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 3, p. 497-501, 1995.

GRIGORAS, S. F.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L.; ELFAKIR, C. Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 794-804, 2013.

GUYOT, S.; MARNET, N.; SANONER, P.; DRILLEAU, J. F. Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 21, p. 6240-6247, 2003.

GUYOT, S.; SERREND, S.; LÉ QUÉRÉ, J. M.; SANONER, S.; RENARD, C. M. G. C. Enzymatic synthesis and physicochemical characterization of phloridzin oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 443-450, 2007.

HUFNAGEL, J. C.; HOFMANN, T. Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1376-1386, 2008.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

KAJDZĀNOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5272-5278, 2011.

KARAMAN, S.; TÜTEN, E.; BASKAN, K. S.; APAK, R. Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 93, p. 867-875, 2012.

KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F. Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. **Phytochemistry**, v. 46, n.3, p. 479-483, 1997.

KENNEDY, M.; LIST, D.; LU, Y.; FOO, L.Y.; NEWMAN, R.H.; SIMS, L.M.; BAIN, P.J.S.; HAMILTON, B.; FENTON, G.. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. In: BERLIN, H.; SPRINGER, V. (Ed.). **Modern methods of plant analyses. Analysis of plant waste materials**. v. 20, p. 75-119, 1999.

KHANIZADEH, S.; TSAO, R.; REKIKI, D.; YANG, R.; CHARLES, M. T.; RUPASINGHE, H. P. V. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 396-401, 2008.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. I. In vitro antioxidant actives of methanol extracts of five Phylanthus species from India. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 344-352, 2007.

LAAKSONEN, O.; KULDJÄRV, R.; PAALME, T.; VIRKKI, M.; YANG, B. Impact of apple cultivar, ripening stage, fermentation type and yeast strain on phenolic composition of apple ciders. **Food Chemistry**, v. 233, p. 29-37, 2017.

LE BOURVELLEC, C.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1672, n. 3, p. 192-202. 2004.

LE DEUN, E.; VAN DER WELF, R.; LE BAIL, G.; LÉ QUERÉ, J. M.; GUYOT, S. HPLC-DAD-MS Profiling of polyphenols responsible for yellow-orange color in apple juices of different French cider apple varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 76757684, 2015.

LÉ GUERNEVÉ, C.; SANONER, P.; DRILLEAU, J. F.; GUYOT, S. New compounds by enzymatic oxidation of phloridzin. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 5, p. 6673-6677, 2004.

LI, N.; TAYLOR, I. S.; FERRUZZI, M. G.; MAUER, L. J. Color and chemical stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in solution and solid states. **Food Research International**, n. 53, p. 909-921, 2013.

LI, N.; TAYLOR, I. S.; FERRUZZI, M. G.; MAUER, L. J. Kinetic study of catechin stability: effects of pH, concentration, and temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 12531-12539, 2012.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Biotechnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. vol.1, cap.1: Produção de Etanol, p.1-43, 2001.

LINARES, A. R.; HASE, S. L.; VERGARA, M. L.; RESNIK, S. L. Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: influence of temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 471-477, 2010.

LOBO, A. P.; GARCÍA, Y. D.; SÁNCHEZ, J. M.; MADRERA, R. R.; VALLES, B. S. Phenolic and antioxidant composition of cider. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 644-648, 2009.

LOHANI, U. C.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; Application of the pulsed electric field to release bound phenolics in sorghum flour and apple pomace. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 35, p. 29-35, 2016.

LORRAIN, B.D.; BALLESTER, J.; THOMAS-DANGUIN, T.; BLANQUET, J.; MEUNIER, J.M.; LE FUR, Y. Selection of potential impact odorants and sensory validation of their importance in typical chardonnay wines. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 54, n. 11, p. 3973-3981. 2006.

LU, Y.; FOO, L.Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 187-194, 1997.

MADRERA, R. R.; LOBO, A. P. VALLES, B. S. Phenolic profile on Asturian (Spain) natural cider. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 210-124, 2006.

MADRERA, R. R.; LOBO, A. P.; ALONSO, J. J. M. Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics in fresh cider spirits. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 70-78, 2010.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MALEC, M.; LE QUÉRÉ, J. M.; SOTIN, H.; KOLODZIEJCZYK, K.; BAUDUIN, R.; GUYOT, S. Polyphenol profiling of a red-fleshed apple cultivar and evaluation of the color extractability and stability in the juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 6944-6954, 2014.

MANGAS, J. J.; RODRIGUEZ, R.; MORENO, J.; SUÁREZ, B.; BLANCO, D. Furanic and phenolic composition of cider brandy. A chemometric study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4076-4079, 1997.

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

MARKS, S. C.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 719-728, 2007.

MASUMOTO, S.; AKIMOTO, Y.; OIKE, H.; KOBORI, M. Dietary phoridzin reduces blood glucose levels and reverses Sglt1 expression in the small intestine in Streptozotocin-induced diabetic mice. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4651-4656, 2009.

MORATA, A. GÓMES-CORDOVÉS, M. C.; SUBERVIOLA, J.; BARTOLOMÉ, B.; COLOMO, B.; SUÁREZ, J. A. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during

the fermentation of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 4084-4088, 2003.

NICOLAS, J. J.; RICHARD FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 2, p. 109-157, 1994.

NIKI, E.; NOGUCHI, N. Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? **IUBMB Life**, v. 50, p. 323-329, 2000.

NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G.; BRACHT, C. K.; PERALTA, R. M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeito do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 191-196, 2010.

NOGUEIRA, A.; GUYOT, S.; MARNET, N.; LEQUÉRÉ, 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, n. 5, p. 1025-1032, 2008.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C.N.; SIMÕES, D.R.S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1089-1098, 2007.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. Q.; SIMÕES, D. R. S.; DRIELLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 2, n. 2, p. 289-298, 2003a.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidrícola. Efeito do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 191 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; WIECHETECK, F. V. B.; GUYOT, S. Efeito do processamento de compostos fenólicos em sucos de maçã. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 9, n. 3, p. 1-14, 2003b.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Apple cider fermentation. In: Handbook of plant based fermented food and beverage technology, **CRC Press**, 2 Ed., p. 209-236, 2012.

PAEPE, D.; VALKENBORG, D.; COULDIJZER, K.; NOTEN, B.; SERVAES, K.; LOOSE, M.; VOORSPOELS, S.; DIELS, L.; VAN DROOGENBROECK, B. Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. **Food Chemistry**, v. 162, p. 176-185, 2014.

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. 1333-1346, 2004.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; WOSIACKI, G. Aproveitamento do bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1231-1238, 2005.

PANNALA, A.S.; CHAN, S.T.; O'BRIEN, J.P.; RICE-EVANS, A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, 2001.

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

PENG, B.; LI, F.; CUI, L.; GUO, Y. Aroma compounds and sensory properties of apple wine. **Institute of Food Technologists**, v. 80, n. 12, p. 2937-2943, 2015.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants – Reviews. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 1999.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑES, M. J. Effect of solvents, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2111-2117, 2005.

PINELO, M.; ZORNOZA, B.; MEYER, A. S. Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 63, n. 3, p. 620-627, 2008.

PLOTTO, A.; MCDANIEL, M. P.; MATTHEIS, J. P. Characterization of “Gala” apple aroma and flavor: Differences between controlled atmosphere and air storage. **Journal of the American Society for Agricultural Science**, v. 124, n. 4, p. 416-423, 1999.

PROTZEK, E. C.; FREITAS, R. J. S.; WASCZYNSKJ, N. Aproveitamento do bagaço de maçã na elaboração de biscoitos ricos em fibra alimentar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 16, n. 2, p. 263-275, 1998.

PUBCHEM. Open Chemistry Data Base. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 10 ago. 2016.

RAZAEI, S.; RAZAEI, K.; HAGHIGHI, M.; LABBAFI, M. Solvents and solvent to sample ratio as main parameters in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from apple pomace. **Food Science Biotechnology**, v. 22, p. 1269-1274, 2013.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

- REID, M. S.; PADFIELD, C. A. S.; WATKINS, C. B.; HARMAN, J. E. Starch iodine pattern as a maturity index for Granny Smith apples. I - Comparison with flesh firmness and soluble solids content. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 25, n. 2, p. 239-243, 1982.
- REIS, S. F.; RAI, D. K.; ABU-GHANNAM, N. Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1991-1998, 2012.
- RITA, R.; ZANDA, K.; DAINA, K.; DALIJA, S. Compositions of aroma compounds in fermented apple juice. Effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1709–1716, 2011.
- RODRÍGUEZ, H.; CURIEL, A.; LANDETE, J. M.; RIVES, B.; FELIPE, F. L.; GÓMEZ-CARDOVÉS, C.; MANCHEÑO, J. M.; MUÑOZ, R. Food phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 79-90, 2009.
- ROGINSKY, V.; ALEGRIA, A. E. Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 53, p. 4529-4535, 2005.
- ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavor. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 169-180, 2003.
- RUIZ-BARBA, J. L.; CATHCART, D. P.; WAMER, P. J.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n. 6, p. 2059–2064, 1994.
- SALMON, J. M.; FORNAIRON, C.; BARRE, P. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 2, p. 154–163, 1998.
- SAMALEH, D.; BRANDAM, C.; MEDAWAR, W.; LTEIF, R.; STREHAIANO, P. Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1661-1667, 2008.
- SANT'ANNA, F.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Kinetic modeling of anthocyanin extraction from grape marc. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 12, p. 3473-3480, 2013.
- SANT'ANNA, F.; BRANDELLI, A.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 100, p. 82-87, 2012.
- SANTOS, C. M. E.; PIETROWSKI, G. A.; BRAGA, S. M.; ROSSI, M. J.; NINOW, J.; SANTOS, T. P. M.; WOSIACKI, G.; JORGE, R. M. M.; NOGUEIRA, A. Apple aminoacid profile and yeasts strains in the formation of fusel alcohols and esters in cider production. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. 1170-1177, 2015.

SATO, M. F.; VIEIRA, R. G.; ZARDO, D. M.; FALÇÃO, L. D.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Apple pomace from eleven cultivars: an approach to identify sources of bioactive compounds. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 29-35, 2010.

SCHIEBER, A.; HILT, P.; STREKER, P.; ENDRE, H. U.; RENTSCHLER, C.; CARLE, R. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 99-107, 2003.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals, functional foods and dietary supplements in health and disease. **Journal of Food & Drug Analysis**, v. 20, p. 226–230, 2012.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Florida: CRC Press, 2004.

SIEBERT, K. J.; CARRASCO, A.; LYNN, P. Y. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1997-2005, 1996.

SILVA, G. J. F.; CONSTANT, P. B. L.; FIGUEIREDO, R. W.; MOURA, S. M. Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 3, p. 429-436, 2010.

SILVA, I.; CAMPOS, F. M.; HOGG, T.; COUTO, J. A. Wine phenolic compounds influence the production of volatile phenols by wine-related lactic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 360-370, 2011.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SIMÕES, D. R. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Aromas em maçãs, suco e sidra: Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 153-172, 2009.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n. 3, p.144-158, 1965.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; Avaliação da atividade antioxidante dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 727-732, 2008.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKI, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Review**, v. 96, n. 7, p. 2563-2605, 1996.

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.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

SUÁRES, B.; ÁLVARES, A. L.; GARCIA, Y. D.; DEL BARRIO, G.; LOBO, A. P.; PARRA, F. Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. **Food Chemistry**, v. 120, p. 339-342, 2010.

SWIGERS, J. H.; FRANCIS, I. L.; HERDERICH, M. J.; PRETORIUS, I. S. Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery: the choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. **Wine Industrial Journal**, v. 21, n.1, p. 34-42, 2006.

SYMONEAUX, R.; CHOLLET, S.; BAUDUIN, R.; LE QUÉRÉ, J. M.; BARON, A. Impact of apple procyanidins on sensory perception in model cider (part 2): Degree of polymerization and interactions with the matrix components. **LWT – Food Science and Technology**, v. 57, p. 28-34, 2014.

SYMONEAUX, R.; LE QUÉRÉ, J. M.; BARON, A.; BAUDUIN, R.; CHOLLET, S. Impact of the CO₂ and its interaction with the matrix components on sensory perception in model cider. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, p. 886-891, 2015.

THOO, Y. Y.; HO, K. S.; LIANG, J. H.; HO, C. W.; TAN, C. T. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). **Food Chemistry**, v. 120, p. 290-295, 2010.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 853-876, 2001.

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, p. 4989-4995, 2005.

TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1018, p. 29-40, 2003.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D. J.; TROMP, M. N. J. L., GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKON, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VAN DER SLUIS, A. A. F.; DEKKER, M.; DE JAGER, A.; JONGEN, W. F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3606-3613, 2001.

VAN DER SLUIS, A. A., DEKKER, M., SKREDE, G. & JONGEN, W. M. F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing

production methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7211-7219, 2002.

VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1073-1080, 2005.

VERDU, C. F.; CHILDEBRAND, N.; MARNET, N.; LEBAIL, G.; DUPUIS, F.; LAURENS, F.; GUILLET, D.; GUYOT, S. Polyphenol variability in the fruits and juices of a cider apple progeny. **Journal of the Science of the Food and Agriculture**, n 94, p. 1305-1314, 2013.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S. VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological tracts. **Food Microbiology**, v. 25, p. 778-785, 2008.

VIROT, M.; TOMAO, V.; LE BOUVERLLAC, C.; RENARD, C. M. C. G.; CHEMAT, F. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, p. 1066-1074, 2010.

WALDBAUER, K., MCKINNON, R.; KOPP, B. Apple pomace as potential source of natural active compounds. **Planta Medica**, v. 83, p. 994-1010, 2017.

WALKER, G. M. Yeast physiology and biotechnology. **Scotland: John Wiley & Sons**, 350p., 1998.

WEIBULL, W.; SWEDEN, S. A statistical distribution function of wide applicability. **Journal of Applied Mechanics**, v. 19, p. 293-297, 1951.

WIJNGAARD, H.; BRUNTON, N. The optimisation of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 36, p. 134-140, 2010.

WIJNGAARD, H.; BRUNTON, N. The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10625-10631, 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, n. 4, p. 291-297, 2000.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de Maçã. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas Não-Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blücher, v. 2, p. 269-302, 2010.

XU, Y.; FAN, M.; RAN, J.; ZHANG, T.; SUN, H.; DONG, M.; ZHANG, Z.; ZHENG, H. Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 379-388, 2016.

XU, Y.; FAN, W.; QIAN, M. C. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporations and headspace solid-phase

microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3051–3057, 2007.

YAN, Y. L.; YU, C. H.; CHEN, J.; LI, X. X.; WANG, W.; LI, S. Q. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tramella mesentrica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 217-224, 2011.

YASSIN, L. S.; ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; OLIVEIRA-EMILIO, H. R.; NOGUEIRA, A. Cytoprotective effect of phenolic extract from Brazilian apple peel in insulin-producing cells. **Current Nutrition e Food Science**, v. 3, p. 1-7, 2017.

YATSU, F. K. J.; BORGHETTI, G. S.; BASSANI, V. L. Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (*Maté*) spray-dried powder. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n.4, p. 413-419, 2011.

YE, M.; YUE, T.; YUAN, Y. Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 2951-2957, 2014.

ZARDO, D. M.; ZIELINSKI, A. A.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Science**, v. 6, p. 727-735, 2015.

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

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZIELINSKI, A. A. F.; BRAGA, C. M.; DEMIATE, I. M.; BELTRAME, F. L.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Development and optimization of a HPLC-RI method for the determination of major sugars in apple juice and evaluation of the effect of the ripening stage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 38-43, 2014.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; BETA, T. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC-DAD-Q-TOF-MS/MS. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 897-907, 2016.

ZIELINSKI, A. A. F.; PRESTES, R. A.; BARBOSA, R.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Apple pulp enzyme treatment with Ultrazym® AFP-L and Panzym® yieldmash. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 55-68, 2014.

ZURIARRAIN, A.; ZURIARRAIN, J.; PUERTAS, A. I.; DUEÑAS, M. P.; OSTRA, M.; BERREGI, I. Polyphenolic profile in cider and antioxidant power. **Journal of the Science of the Food and Agriculture**, v. 95, p. 2931-2943, 2014.