

**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**

**DÉBORA GONÇALVES BORTOLINI**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO BAGAÇO IMOBILIZADO NA EVOLUÇÃO DOS  
COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DE  
MOSTO DE MAÇÃ**

**PONTA GROSSA**

**2018**

**DÉBORA GONÇALVES BORTOLINI**

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO BAGAÇO IMOBILIZADO NA EVOLUÇÃO DOS  
COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DE  
MOSTO DE MAÇÃ**

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

Orientador: Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski.

**PONTA GROSSA**

**2018**

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

B739 Bortolini, Débora Gonçalves  
Influência da adição do bagaço  
imobilizado na evolução dos compostos  
fenólicos durante o processo fermentativo  
de mosto de maçã/ Débora Gonçalves  
Bortolini. Ponta Grossa, 2018.  
82f.

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

Orientador: Prof. Dr. Acácio Antonio  
Ferreira Zielinski.

1.Sidra. 2.Subproduto. 3.Atividade  
antioxidante. 4.CLAE. I.Zielinski, Acácio  
Antonio Ferreira. II. Universidade  
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 634.11

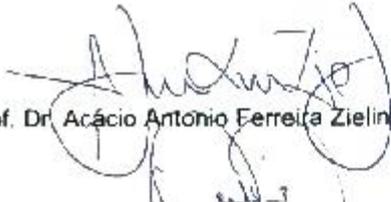
**TERMO DE APROVAÇÃO**

**DÉBORA GONÇALVES BORTOLINI**

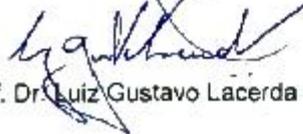
**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO BAGAÇO IMOBILIZADO NA EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO DO MOSTO DE MAÇÃ.**

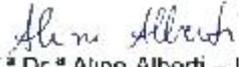
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

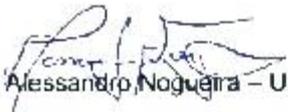
Orientador:

  
Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski – UEPG /PR

  
Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk – UTFPR

  
Prof. Dr. Luiz Gustavo Lacerda – UEPG /PR

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

  
Prof. Dr. Alessandro Nogueira – UEPG /PR

Ponta Grossa, 02 de março de 2018

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus pela minha vida e por todas as bênçãos recebidas.

Aos meus pais, Hélio Ari Bortolini e Leonice Gonçalves, pelo amor concedido, apoio e por todas as vezes que renunciarem seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

Aos meus irmãos, Thiago Aguiar Bortolini, Bruna Gonçalves Bortolini e Luiza Gonçalves Bortolini pela compreensão e carinho.

Ao professor Acácio Antonio Ferreira Zielinski pela orientação, paciência e amizade.

Aos professores Aline Alberti e Alessandro Nogueira por todo apoio e ideias no decorrer do trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aos professores membros da banca, Dr. Alessandro Nogueira, Dr<sup>a</sup>. Aline Alberti, Dr. Luiz Gustavo Lacerda, e Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk pelo aceite do convite.

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

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A Laís Benvenuti, por todo auxílio na realização do trabalho, sobretudo, pela amizade.

Aos amigos Rafaela Gomes da Silva, Daniel Sena Marins, Luísa Thomaz, Lucas Henrique Waiga, Giuliane Sviercoski e Amanda Alves Prestes, por todos os momentos de aprendizado e descontração.

Aos integrantes do Grupo de Trabalho sobre Maçã (GTM) pela acolhida e pelos ensinamentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A maçã, uma das frutas mais produzidas no mundo, tem sido consumida de diferentes formas, como em frutas *in natura*, sucos, produtos fermentados como sidras, bebidas destiladas, vinagres, além de geleias e frutas desidratadas. O aumento da escala de produção de sucos e sidras leva ao incremento da geração do bagaço. Este resíduo caracteriza como sendo uma fração rica em fibras, açúcares e compostos fenólicos com atividade antioxidante que não são totalmente extraídos durante o processamento. Portanto, o bagaço apresenta potencial para ser utilizado no melhoramento da qualidade de alimentos e bebidas. O objetivo deste trabalho foi estudar a extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã imobilizado durante a fermentação de sidras, bem como, a evolução destes compostos no decorrer da fermentação e seu impacto na qualidade sensorial. Foram utilizadas maçãs da cultivar Fuji para produzir 20 sidras, as quais foram divididas em dois grupos: sidra I, controle ou sem adição de bagaço imobilizado, e sidra II, com adição de bagaço imobilizado. A fermentação das sidras foi interrompida, em duplicata, nos dias 1, 4, 7, 11 e 15 de fermentação, obtendo duas frações: as sidras e os bagaços fermentados, os quais foram submetidos a extrações consecutivas em metanol e acetona para análise da composição fenólica. Foram realizadas análises de nitrogênio total, cor, pH, acidez total, composição fenólica total, atividade antioxidante, além de composição fenólica individual, composição de açúcares, etanol e sorbitol por CLAE. Também foi realizada análise sensorial com 8 julgadores conhecedores do produto, onde foram avaliados os atributos de acidez, amargor, adstringência, cor e qualidade do odor por meio de escalas estruturadas. Foi observado uma redução do pH e aumento da acidez das sidras no decorrer da fermentação. Durante a fermentação foi observado um decréscimo de 40% dos compostos fenólicos totais da sidra I, o que pode estar relacionado à adsorção dos compostos na parede celular de leveduras e a bioconversão de compostos. No entanto, a sidra II apresentou 93 mg/L a mais de compostos fenólicos totais do que a sidra I, devido a extração desses compostos do bagaço, e por consequência, maior atividade antioxidante. Flavonoides, especialmente os flavonóis (quercetina-3-rutinosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-β-D-glucosídeo, quercetina-3-D-xilosídeo, quercetina-O-α-L-arabinofuranosídeo e quercetina-3-O-raminosídeo) foram a principal classe de compostos extraída. Além disso, ocorreu uma extração de açúcares, no início da fermentação da sidra II, o que impactou no seu teor alcoólico que foi mais alto do que na sidra I. Foi observado um residual de frutose nas sidras, o qual foi 0,3 g/L superior na sidra II. A cor de ambas as sidras foi amarela ( $h^\circ$  próximo  $90^\circ$ ), porém, a sidra II apresentou maior luminosidade. Segundo os resultados da análise sensorial, a sidra II foi mais amarga e menos ácida e a cor foi mais clara. A adstringência das duas bebidas não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ). A qualidade do odor foi avaliada por método afetivo, sendo que ambas as sidras receberam notas entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. Nos bagaços residuais, após a fermentação, como esperado houve uma redução da quantidade de fenóis e da atividade antioxidante. Também foi observado um aumento na quantidade de nitrogênio no resíduo, devido à retenção de leveduras e também pela extração de compostos como açúcares, o que pode concentrar outros constituintes. Portanto, a utilização do bagaço imobilizado na fermentação pode melhorar a qualidade sensorial de sidras, diminuindo a percepção da acidez, aumentando o amargor e melhorando a cor da bebida, sem alterar a percepção da adstringência, além de aumentar a sua composição fenólica e atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Sidra, subproduto, atividade antioxidante, CLAE.

## ABSTRACT

The apple, one of the fruit more produced in the world, has been consumed in different ways, such as in raw fruits, juices, fermented products such as cider, distilled beverages, vinegar, as well as jams and dried fruits. The increase of the production scale of juices and ciders leads to increase of apple pomace production. This by-product characterizes as a fraction rich in fibers, sugars and phenolic compounds with antioxidant activity which are not totally extracted in the process. Therefore, the apple pomace shows potential to be used to improve the quality of foods and beverages. The aim of this work was to study the extraction of phenolic compounds from apple pomace immobilized during the fermentation of ciders. As well as, the evolution of this compounds during the fermentation and their impact on sensorial quality. It was used apples from Fuji variety to make 20 ciders, which were divided in 2 groups: cider I, control or without apple pomace addition, and cider II, with addition of apple pomace immobilized. The ciders fermentation were stopped, in supuplicate, in the 1<sup>st</sup>, 4<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days of fermentation, obtaining 2 fractions: the ciders and the fermented apple pomace, which were submitted to two consecutive extractions of methanol and acetone to phenolic composition analysis. It were carried out analysis od total nitrogen, color, pH, total titratable acidity, total phenolic composition, antioxidant activity, as well as individual phenolic composition, sugars, ethanol and sorbitol by HPLC. It was also carried out sensory analysis with 8 judges that knew the product, where it was evaluated the attributes of sourness, bitterness, astringency, color and odour quality by structured scales. It was observed a decrease of pH and an increase of titratable acidity of the ciders during fermentation. During the fermentation it was observed a reduction of 40% of total phenolic compounds of cider I, which can be related with the adsorption of compounds on cell wall of yeasts and the bioconversion of compounds. However, the cider II showed 93mg/L more total phenolic compounds than cider I, due the extraction of this compounds from apple pomace, and consequently, higher antioxidant activity. Flavonoids, especially flavonols (quercetin-3-rutinoside, quercetin-3-D-galactoside, quercetin-3- $\beta$ -D-glucoside, quercetin-3-D-xyloside, quercetin-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside e quercetin-3-O-rhaminoside) was the main class of compounds extracted. Furthermore, occurred a extraction of sugars, in the beginning of fermentation of cider II, which impacted on their alcoholic degree which was higher on than cider I. It was observed a residual of fructose on ciders which was 0.3 g/L higher on cider II. The color of both ciders were yellow ( $h^\circ$  near 90 $^\circ$ ), however, cider II showed higher lightness. Second the sensorial analysis results, the cider II ware more bitter and less sour, and their color was more light. The astringency for both beverages did not show significative difference ( $p > 0.05$ ). the odour quality was evaluated by affective method, being the both ciders received notes between “ I liked quickly” and “I liked moderately”. In the residual apple pomaces, after fermentation, as expected had a reduction of the quantity of phenols an antioxidant activity. It was also observed an increase of total nitrogen, due the yeasts cell retention and also by extraction of sugars, which can concentrate other constituents. Therefore, the use of immobilized apple pomace on fermentation can improve the sensorial quality of ciders, reducing the perception of sourness, increasing the bitterness e improving the color of the beverage, without modify the perception of astringency, futhermor uncrease their phenolic composition and antioxidant activity.

**Keywords:** Cider, by-product, antioxidant activity, HPLC.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Teor alcoólico de sidras segundo a legislação de cada país.....	18
Figura 1.2: Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos encontrados em maçãs.	23
Figura 1.3: Estrutura básica de um flavonoide.....	26
Figura 2.1: Fluxograma do processamento das Sidras. ....	38
Figura 2.2: Desenho dos fermentadores das sidras I e II.....	39
Figura 2.3: Fermentação das sidras para análise da evolução dos compostos fenólicos.....	40
Figura 2.4: Nitrogênio nos bagaços de maçã fermentados.....	60
Figura 2.5: Composição fenólica individual dos bagaços durante a fermentação.....	65
Figura 2.6: Diferenças nos atributos sensoriais descritivos das sidras I e II. ....	66

TOSC: capacidade de captura de oxiradical total

TRAP: aprisionamento do radical peroxil

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Teor alcoólico de sidras segundo a legislação de cada país. ....	16
Tabela 1.2: Variação da composição fenólica de derivados da maçã. ....	25
Tabela 1.3: Atividade antioxidante de compostos fenólicos determinada por diferentes métodos. ....	28
Tabela 2.1: Características físico-químicas do mosto e das sidras. ....	48
Tabela 2.2: Parâmetros de cor do mosto e das sidras. ....	52
Tabela 2.3: Composição e atividade antioxidante in vitro do mosto e das sidras durante a fermentação alcoólica. ....	56
Tabela 2.4: Composição fenólica individual das sidras. ....	58

## LISTA DE SIGLAS

ABPM: Associação Brasileira de Produtores de Maçãs.  
ABTS: atividade antioxidante pela descoloração do cátion ABTS.  
AC: ácido *p*-cumárico  
ACE: ácido cafeico  
ACQ: ácido 5-cafeoilquínico  
CAT: (+)-catequina  
CFT: compostos fenólicos totais  
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.  
COEP: comitê de ética em pesquisa  
CUPRAC: atividade antioxidante pela redução do cobre  
DPPH: atividade antioxidante pela captura do radical DPPH.  
EMBRAPA: empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EPI: (-)-epicatequina  
ET: transferência de elétron  
FLA: flavanóis totais  
FLO: flavonóis totais.  
FRAP: atividade antioxidante pela redução do íon férrico.  
FT: flavonoides totais.  
HAT: transferência de um átomo de hidrogênio  
HPLC: high performance liquid chromatography  
LOD: limite de detecção  
LOQ: limite de quantificação  
ORAC: capacidade de absorvência do radical oxigênio  
PPO: polifenol oxidase  
QAF: quercetina-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo.  
QGAL: quercetina-3-D-galactosídeo  
QGLU: quercetina-3- $\beta$ -D-glucosídeo  
GRAM: quercetina-3-O-raminosídeo  
QRU: quercetina 3-rutinosídeo  
QXI: quercetina-3-D-xilosídeo  
ROS: espécies reativas ao oxigênio  
TE: Trolox equivalente

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
OBJETIVO GERAL .....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 MAÇÃ</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2 SIDRAS</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 Qualidade das sidras .....	17
1.2.2 Processamento das sidras .....	18
1.2.3 Bagaço de maçã .....	20
<b>1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS</b> .....	<b>22</b>
1.3.1 Flavonoides.....	26
1.3.2 Ácidos fenólicos.....	26
<b>1.4 RADICAIS LIVRES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5 ANÁLISE SENSORIAL</b> .....	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>32</b>
<b>EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SIDRA COM BAGAÇO IMOBILIZADO</b> .....	<b>32</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>2.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
2.2.1 Materiais .....	37
2.2.2 Processamento do mosto e obtenção dos bagaços .....	37
2.2.3 Fermentação das sidras .....	38
2.2.4 Cinética da fermentação.....	39
2.2.5 Evolução dos compostos fenólicos .....	39
2.2.6 Extração dos compostos fenólicos do bagaço para análises .....	40
2.2.7 Caracterização das sidras e dos bagaços de maçã.....	41
2.2.8 Análise sensorial .....	44
2.2.9 Análise estatística.....	46
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
2.3.2 Efeito na composição fenólica e na atividade antioxidante <i>in vitro</i> das sidras.....	53
2.3.3 Efeito da utilização do bagaço imobilizado na evolução dos compostos fenólicos individuais.....	57
2.3.4 Efeito da fermentação na composição do bagaço de maçã .....	60
2.3.5 Impacto na análise sensorial das sidras.....	65
<b>2.4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>68</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>81</b>

## INTRODUÇÃO

A produção de maçã em escala comercial no Brasil vem se desenvolvendo desde 1969, quando os primeiros pomares foram plantados, na cidade de Fraiburgo, em Santa Catarina. A quantidade de maçãs produzidas supre o mercado interno e também as exportações, compreendendo um segmento importante da fruticultura brasileira. Devido ao clima, a produção se concentra principalmente nos estados da região Sul do país. Entre as cultivares plantadas no Brasil, a maior parte da produção se divide entre Gala e Fuji. Entretanto, pesquisas têm sido realizadas entre universidades em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) visando à produção de cultivares menos exigentes ao clima (maçãs Eva e Princesa), em São Paulo e no Nordeste.

Aproximadamente 30% da produção de maçãs não atende as exigências do mercado para o consumo *in natura*. Desse modo, as frutas acabam sendo destinadas ao processamento industrial (sucos e produtos fermentados como a sidra). A sidra corresponde a uma bebida elaborada a partir da fermentação de mostos de maçãs, que pode ser gaseificada ou não, adoçada e diluída para padronização. Essa bebida tem sido valorizada no Brasil e no mundo. Entretanto, o consumo no Brasil ainda é limitado, ocorrendo principalmente em festas de fim de ano.

O principal resíduo do processamento da maçã, o bagaço, corresponde à fração obtida da torta de prensagem de maçãs raladas para obtenção do suco/mosto. Este apresenta uma alta taxa de umidade e grande quantidade de açúcares residuais que proporcionam um ambiente favorável à proliferação microbiana, dificultando o seu armazenamento até mesmo em um curto período em condições ambientais. Além disso, o material apresenta grande quantidade de compostos fenólicos, os quais conferem atividade antioxidante.

A utilização do bagaço geralmente ocorre como inserção na alimentação animal ou na disposição direta no solo como adubo orgânico. O armazenamento deste resíduo úmido por tempo prolongado pode provocar uma fermentação espontânea, da qual o etanol e outros compostos produzidos podem ser prejudiciais a saúde dos animais. A disposição deste material no solo desperdiça grande quantidade de compostos bioativos que poderiam ser aproveitados de outra maneira. Portanto, o bagaço apresenta potencial para ser utilizado no aumento da composição de compostos bioativos, especialmente fenóis, de outros alimentos e bebidas.

Os compostos fenólicos, metabólitos secundários das plantas, apresentam função de proteção contra adversidades como infecções, ferimentos e radiações ultravioleta. Nos seres humanos, a ingestão destes compostos pode reduzir os riscos de várias doenças como Alzheimer, câncer e diabetes, sendo este o fator responsável pelo aumento do consumo destes produtos. Nas maçãs, as principais classes de compostos fenólicos encontrados compreendem os flavonoides e os ácidos fenólicos. A primeira pode ser subdividida em flavanóis ((+)-catequina e (-)-epicatequina), flavonóis (glucosídeos de quercetina) e dihidrochalconas (floreína 2'-xiloglucosídeo e floreína 2'- $\beta$ -D-glucosídeo), ao passo que a segunda apresenta os ácidos 5-cafeoilquínico, cafeico e *p*-cumárico como principais representantes do grupo.

Em busca de alternativas para o reaproveitamento deste subproduto, o uso do bagaço desidratado e imobilizado na fermentação de mostos pode consistir na recuperação e valorização dos compostos retidos, melhorando os fermentados em termos de quantidade/qualidade de sua composição.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a extração dos compostos fenólicos durante a fermentação do mosto de maçã utilizando bagaço de maçã imobilizado durante a fermentação, bem como a evolução dos compostos extraídos e seu impacto na qualidade sensorial da sidra.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

- *Determinar* o impacto da utilização do bagaço de maçã para aplicação em sidras reincorporadas com compostos fenólicos por meio da imobilização do bagaço durante a fermentação alcoólica.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Analisar* a viabilidade da utilização do bagaço imobilizado durante a fermentação de sidras.
- *Determinar* diferenças nos parâmetros físico-químicos das sidras fermentadas com bagaço e controle.
- *Avaliar* diferenças na composição fenólica e atividade antioxidante entre sidras fermentadas com bagaço desidratado e sidras controle.
- *Analisar* o perfil fenólico individual bem como sua evolução nas sidras no decorrer da fermentação alcoólica.
- *Utilizar* análise sensorial com equipe selecionada para descrever as sidras.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

## 1.1 MAÇÃ

A maçã (*Malus domestica* Borkh.), uma das frutas mais produzidas e consumidas no mundo, apresenta frutos médios, de coloração amarela, verde ou vermelha, dependendo da cultivar, textura crocante, sabor doce e acidez equilibrada para o consumo *in natura*. Na França, algumas cultivares foram aprimoradas para produção de sucos e sidras, entretanto, no Brasil, as maçãs utilizadas pela indústria são provenientes do descarte comercial (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

A macieira se adapta bem nas regiões mais frias, como no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai. Por este motivo, o primeiro plantio comercial Brasil ocorreu em 1969, na cidade de Fraiburgo (Santa Catarina), com mudas provenientes da França (ABPM, 2015). Nessa época, a produção era menor que 15 ton por ano, entretanto, no ano de 2014 a produção atingiu aproximadamente 1,2 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016). A produção se concentra nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e Paraná, os quais representaram, em 2015, 52,6%, 43,9% e 3,5% do total da produção, respectivamente (ABPM, 2015).

Estudos têm sido realizados a fim de implantar o cultivo de maçãs em regiões que não apresentam clima favorável, como na China (LIU et al., 2008), Etiópia (ASHEBIR et al., 2010) e Kenia (NJUGUNA et al., 2010), tornando-se possível devido ao emprego de cultivares adaptadas a essas condições. No Brasil, a produção se expandiu a regiões Sudeste e Nordeste, cujo clima difere muito da região Sul. De acordo com a EMBRAPA (2014), o excesso de chuvas, que prejudica a floração e a colheita na região Sul, bem como a ocorrência de granizo e geadas, são praticamente inexistentes no Nordeste. Sobretudo, a baixa incidência de doenças e pragas pode permitir até duas safras por ano na mesma planta. As cultivares utilizadas para este fim, Eva e Princesa, apresentam baixa exigência ao frio e se adaptam bem a regiões com inverno suave, o que viabiliza sua produção no Pernambuco e na Bahia (LOPES et al., 2013; MIRANDA et al., 2015), Em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2014) e em São Paulo (CHAGAS et al., 2012). Em 2013, no terceiro ano de cultivo, as áreas estudadas no Nordeste pela EMBRAPA apresentaram produtividade de maçãs de 28 ton/ha, quase o dobro da produção no Sul do país (15 ton/ha) (FABIO, 2013).

Maçãs Fuji e Gala correspondem as principais cultivares produzidas. Estudos em termos de melhoramento genético, hibridizações, seleção de mutações e clones fazem com que o número de cultivares de maçãs diferentes produzidas no mundo cresça cada vez mais

(CETNARSKI FILHO; CARVALHO; MARTINS, 2008). No Brasil, as principais cultivares produzidas correspondem a Fuji e a Gala.

A Fuji, uma das cultivares mais produzidas no mundo no ano de 2014 (YE; YUE; YUAN, 2014), teve origem no Japão, como resultado do cruzamento de duas outras cultivares, Ralls Janet e Red Delicious. Os frutos são muito apreciados pelos consumidores devido a sua suculência, sabores ácido e doce equilibrados e textura crocante. A aparência com coloração vermelha rajada com fundo esverdeado, e o tamanho dos frutos, que varia de médio a grande também se considera como atrativos. A cultivar Gala por sua vez, tem origem na Nova Zelândia, entre o cruzamento das cultivares Kidd, Orange Red e Golden Delicious. Essa cultivar apresenta frutos de tamanho médio e coloração vermelha com fundo amarelo (CETNARSKI FILHO; CARVALHO; MARTINS, 2008).

Do total de maçãs produzidas no Brasil, por volta de 70% se destinam ao consumo *in natura*. A outra parte (30%) compreende maçãs com defeitos (coloração, tamanho e uniformidade das frutas fora do padrão, presença de injúrias mecânicas e/ou podridões), as quais são tratadas como descarte comercial, sendo aproveitadas pela indústria e processadas principalmente como sucos e sidras, além de purês, geleias e frutas secas em uma menor escala (LAVELLI; KERR, 2012).

## 1.2 SIDRAS

A sidra, bebida alcoólica de maçã, está cada vez mais popular no mundo (YE; YUE; YUAN, 2014). Essa bebida pode ser caracterizada por fermentado do mosto de maçã, podendo ser gaseificada ou não, e de teor alcoólico baixo, entre 2,0 e 7,0 °GL (SYMONEAUX et al., 2014; SANTOS et al., 2015). O teor alcoólico pode variar de acordo com a legislação de cada país, como Alemanha e França legalizaram um valor mínimo, enquanto outros países, como a Inglaterra, estimaram um teor alcoólico máximo para as sidras (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1.1: Teor alcoólico de sidras segundo a legislação de cada país.

País	Mínimo (% v/v)	Máximo (% v/v)
Alemanha	5	nd
Brasil	4	8
França	4	nd
Inglaterra	Nd	8

Nota: nd: valor não determinado.

Fonte: Adaptado de Nogueira e Wosiacki (2012).

No Brasil, a legislação vigente, Decreto n° 6.871 de 04 de junho de 2009, que regulamenta a Lei n° 8.918, de 14 de julho de 1994, regulamenta a 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. A sidra poderá ser gaseificada, sendo proibida a denominação sidra-champanha, espumante ou expressão semelhante. A sidra poderá ser desalcoolizada por meio de processo tecnológico adequado e, neste caso, deverá ser denominada de sidra sem álcool, desde que o teor alcoólico seja menor ou igual a meio por cento em volume. A sidra pode ser adicionada de açúcares, somente para adoçamento, e de outros aditivos. (BRASIL, 1994; BRASIL, 2009).

### 1.2.1 QUALIDADE DAS SIDRAS

A sidra brasileira não apresenta um padrão alto de qualidade. Na década de 70 a produção dessa bebida foi modificada, a fim de obter uma bebida similar a *champagne*, a qual é consumida principalmente em festas de final de ano. Para isso, as maçãs raladas passaram a ser adicionadas de dióxido de enxofre (sulfito), o que inibe o escurecimento enzimático, mantendo a cor clara nas bebidas, além de atuar contra possíveis contaminações por micro-organismos (CARVALHO et al., 2010).

As maçãs utilizadas para produção de sidras no Brasil podem apresentar defeitos morfológicos e fisiológicos, tamanho, uniformidade da coloração da casca e forma fora do padrão, bem como injúrias mecânicas, podridões e estádios de maturação inadequados (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012; BRAGA et al., 2013; GOMES et al., 2014). De maneira geral, essas frutas apresentam a mesma composição de maçãs de mesa, entretanto, o uso de frutas com problemas fitossanitários pode influenciar negativamente na qualidade do produto (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

Práticas como adição de água e de açúcares são permitidas para correção da graduação alcoólica das sidras (entre 4 e 8 °GL), segundo a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2009). Por consequência, essa operação dilui os compostos fenólicos e compostos aromáticos, os quais exercem papel importante na qualidade sensorial dessas bebidas.

Na Europa, porém, a sidra é consumida e apreciada durante todas as épocas do ano. As maçãs utilizadas no processamento da sidra francesa são conhecidas como maçãs industriais, as quais foram selecionadas devido a sua quantidade de taninos, compostos que conferem maior acidez e adstringência às bebidas, tornando-as refrescante (NOGUEIRA et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; LOS et al., 2017).

### 1.2.2 PROCESSAMENTO DAS SIDRAS

A produção de sidras envolve duas operações unitárias principais: a extração do mosto e a fermentação (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). A extração do mosto (Figura 1.1) inicia com a recepção das frutas, as quais passam por um processo de seleção, retirando frutos que apresentam contaminação por fungos ou partes deterioradas (NOGUEIRA et al., 2003).

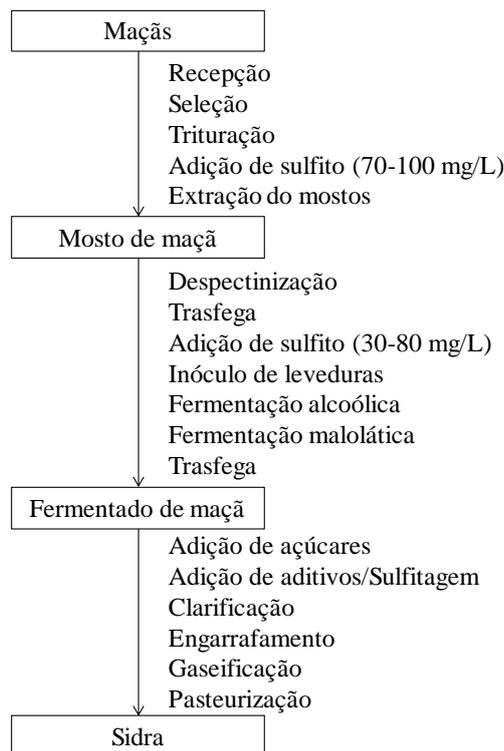


Figura 1.1: Teor alcoólico de sidras segundo a legislação de cada país.  
Fonte: Adaptado de Nogueira et al. (2003); Nogueira; Wosiacki (2012).

Na sequência, essas frutas devem passar por uma etapa de higienização por imersão ou aspersão de água, e em seguida, uma sanitização com cloro ativo, para garantir a qualidade microbiológica. Gomes et al. (2014) indicam que as maçãs devem ser imersas em solução de cloro na concentração de 200 ppm, a 10 °C, durante 10 min. A próxima etapa, trituração, reduz a matéria prima em frações menores, aumentando a área superficial e melhorando a extração (CARVALHO et al., 2010). A massa obtida deve ser então submetida à extração do mosto, que pode ser realizada em prensas de pistão ou em esteiras. Esta etapa gera o principal subproduto desta agroindústria, o bagaço de maçã, representado por uma fração rica em fibras, açúcares e compostos fenólicos com atividade antioxidante. O mosto então pode ser tratado com enzimas pectinolíticas para a clarificação e receber a primeira adição de sulfito

(30 - 80 mg/L), o qual age como conservante nestas bebidas (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Após a decantação, o mosto deve ser trasfegado com auxílio de mangueiras devidamente higienizadas, submetido à fermentação anaeróbia, que pode ser espontânea ou por meio de inóculo de levedura comercial. Com esse processo se obtém o fermentado de maçã, líquido que pode ser usado como base para fabricação de outros produtos, como sidras ou vinagres de maçã. Quando o fermentado de maçã se destina a produção de sidras, pode ser diluído para a padronização do teor alcoólico e adicionado de açúcares (BRASIL, 2009). A bebida também pode ser adicionada de aditivos como sulfito, o qual atua como conservante. As sidras podem ser então engarrafadas e gaseificadas. A pasteurização pode ser realizada caso as sidras não sejam adicionadas de conservante (sulfito) durante o processamento. Essa etapa visa a garantia microbiológica das bebidas.

#### 1.2.2.1 FERMENTAÇÃO

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio, realizado por meio de microrganismos, no qual o açúcar é degradado em etanol e gás carbônico, produzindo energia. O sucesso da fermentação depende da quantidade de açúcares, e das concentrações de nitrogênio e oxigênio no meio (RETTORI; VOLPE, 1999). Estudos mostram que o nitrogênio em concentrações de nitrogênio acima de 75 mg/L evitam fermentações lentas (ALBERTI et al., 2011; SANTOS et al., 2015).

Durante a fermentação ocorrem diversas reações bioquímicas fundamentais para a produção de bebidas (ROZA et al., 2003). O processo fermentativo pode ser subdividido em duas etapas: a fermentação principal ou fermentação alcoólica, e a fermentação secundária ou malolática, a qual nem sempre ocorre.

A fermentação alcoólica, por sua vez, pode ser subdividida em duas fases: a fase oxidativa, onde se formam alguns aromas, e a fase fermentativa, onde os açúcares se transformam em álcool etílico e gás carbônico pelo metabolismo de leveduras (NOGUEIRA, 2003). No início dessa fermentação, parte dos açúcares é utilizada para o desenvolvimento da biomassa. A fermentação da glucose (Equação 1), ocorre por meio da via glicolítica, onde cada molécula de glucose reage com 2 ADP, sendo transformada em duas moléculas de ácido pirúvico, liberando hidrogênio e energia. As moléculas de ácido pirúvico são reduzidas então em etanol, liberando duas moléculas de CO<sub>2</sub> e 2 ATP (RETTORI; VOLPE, 1999, BASSO et al., 2011).



O término da fermentação alcoólica ocorre após o consumo total dos açúcares pelas leveduras. Entretanto esse processo pode ser interrompido um pouco antes do consumo total destes compostos, por meio da centrifugação da sidra, visando à retirada das células de leveduras, mantendo açúcares residuais na sidra (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

A fermentação secundária, denominada fermentação malolática, nem sempre ocorre. O objetivo desta segunda fermentação é melhorar o sabor das sidras. Para isso, as bactérias lácticas acidificam o meio através da reação de descarboxilação, onde ocorre a transformação de um ácido dicarboxílico (ácido málico) em ácido monocarboxílico (ácido láctico) (HERRERO et al., 2005).

### 1.2.3 BAGAÇO DE MAÇÃ

Como apresentado, o processo de prensagem de maçãs raladas para obtenção de sucos gera o bagaço, o principal resíduo desta agroindústria. A quantidade de bagaço produzido depende de alguns fatores, como a variedade da maçã e seu estágio de maturação, tipo de prensagem e uso de tratamentos enzimáticos diferentes (MADRERA; VALLES, 2011). Entretanto, estima-se que o bagaço contém entre 20 e 30% do peso inicial das maçãs (MADRERA et al., 2017), o qual é composto por partes da fruta como epicarpo e mesocarpo (94,5%), sementes (4,4%) e endocarpo (1,1%) (KENNEDY et al., 1999; SATO et al., 2010). As cascas das maçãs, principal componente do bagaço, apresentam maior quantidade de compostos fenólicos do que a polpa e o centro da fruta, especialmente ácidos fenólicos: ácido 5-cafeoilquínico, ácido *p*-cumaroilquínico e ácido *p*-cumárico; flavanóis: catequina, epicatequina, procianidina B2 e outras procianidinas não identificadas; flavonóis: quercetina 3-O-rutinosídeo, quercetina 3-O-galactosídeo, quercetina 3-O-glucosídeo, quercetina 3-O-xilosídeo, quercetina 3-O-arabinosídeo e quercetina 3-O-raminosídeo; dihidrochalconas: fletina 2'-O-xiloglucosídeo e fletina 2'-O-glucosídeo; além de antocianinas: cianidina 3-O-galactosídeo (SCHIEBER et al., 2003; LAVELLI; CORTI, 2011). Esses compostos apresentam atividade antioxidante e devido a isto este resíduo tem ganhado atenção (PAMAR; SHARMA; VASANTHA RUPASINGUE, 2015). O bagaço também contém açúcares (frutose, glucose e sacarose), o que aliada a alta umidade, pode gerar instabilidade microbiológica, levando a fermentação do subproduto (GASSARA et al., 2012). Desse modo, a desidratação deste material pode ser uma alternativa para facilitar seu armazenamento. Além

disso, o bagaço apresenta uma fração rica em fibras, que poderiam ser incorporadas na fabricação de outros alimentos e bebidas.

Na Europa, as principais aplicações do bagaço de maçã incluem a disposição direta no solo e a recuperação da pectina (REIS; RAI; ABU-GHANNAM, 2014). No Brasil, o principal destino deste resíduo tem sido a disposição direta em solos agricultáveis para adubação, ou utilizado como complemento da alimentação animal (MAGYAR et al., 2016). O destino inadequado do bagaço de maçã pode causar problemas ambientais (SATO et al., 2010). Contudo, o aproveitamento e a valorização do bagaço auxiliam na redução da poluição do ambiente, além de proporcionar a utilização de fontes naturais para elaboração de alimentos melhorados do ponto de vista nutricional e/ou recuperação de biomoléculas funcionais (BUSHAN et al., 2008).

A partir do aumento de volume de bagaço de maçã produzido a cada ano, surge a necessidade de novas aplicações para o aproveitamento do mesmo (REIS; RAI; ABU-GHANNAM, 2014). Assim, o bagaço deixa de ser tratado como resíduo e passa a ser tratado como subproduto. Entre as aplicações destacam-se: extração de compostos fenólicos (BAI; ZHANG; REN, 2012; PAMAR; SHARMA; VASANTHA RUPASINGUE, 2015), extração de complexos naturais de sabores (BOSSE; FRAATZ; AZORN, 2013), e desenvolvimento de novos alimentos funcionais (REIS; RAI; ABU-GHANNAM, 2014).

O bagaço de maçã também pode ser usado com finalidade de aumentar a composição nutricional e modificar propriedades dos alimentos (LAVELLI; KERR, 2012). Por conter carboidratos, pectina, fibra bruta e minerais, pode ser considerado um ótimo substrato para fermentação (SHALINI; GUPTA, 2010).

Alguns estudos da fermentação do bagaço de maçã para a obtenção de diferentes produtos têm sido realizados. Ajila et al. (2012) estudaram a fermentação sólida de bagaço de maçã, e algumas reações bioquímicas que ocorrem durante este processo. A composição fenólica total aumentou até o sétimo dia de fermentação, de 15,53 para 29,28 mg GAE/g (miligramas de ácido gálico equivalente por grama de amostra) em base seca nos extratos obtidos com solvente acetona. Esse aumento foi atribuído à ação de enzimas utilizadas no metabolismo de carboidratos, que rompe paredes celulares, liberando compostos fenólicos do interior da célula. Após o sétimo dia o teor de compostos fenólicos diminuiu de 29,28 para 15,14 mg GAE/g, fenômeno atribuído à polimerização e lignificação dos polifenóis. Da mesma forma, a atividade antioxidante apresentou um aumento até o sétimo dia com posterior declínio, devido à variação na composição fenólica.

Madrera et al. (2013) elaboraram aguardente a partir do bagaço de maçã desidratado e leveduras selecionadas. Foram utilizadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarum*, e enzimas comerciais (Pectina metil esterase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -xilosidase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase) combinadas com as leveduras descritas anteriormente. O tratamento enzimático com pectina metil esterase apresentou bebidas com excessivas concentrações de metanol (acima de 1500 g/hL), não podendo ser indicado para este fim. O uso de diferentes cepas proporcionou diferença na composição aromática e a utilização do bagaço desidratado proporcionou maior estabilidade de armazenamento, permitindo a disponibilidade da matéria prima em épocas não sazonais para elaboração de destilados de maçã.

Como apresentado, o bagaço de maçã contém importantes compostos fenólicos oriundos da fruta, os quais podem ser aproveitados para melhoria da qualidade de alimentos e bebidas como a sidra. Semelhante à produção de vinhos, onde as cascas das uvas passam pelo processo de maceração, a imobilização do bagaço de maçã durante a fermentação de sidras pode ser uma alternativa para o aproveitamento destes compostos. Na maceração, as cascas das uvas fermentam juntamente com o mosto, visando à extração de compostos fenólicos. Essa extração ocorre primeiramente por dissolução, e posteriormente por difusão (RIZZON; MIELE; MENEGUZZO, 1999). Portanto, a fermentação de bagaços de maçã juntamente com os mostos apresenta potencial para a extração de compostos fenólicos e aumento da atividade antioxidante.

### 1.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

A estrutura básica de um composto fenólico apresenta um anel aromático com uma hidroxila substituinte. Compostos mais complexos apresentam mais de uma hidroxila substituinte e outros derivados funcionais, os quais os diferenciam em termos de reatividade e estrutura química (SHAHIDI; NACZK, 2004). Nas plantas, os fenóis são metabólitos secundários que se formam devido à exposição a adversidades como infecções, ferimentos e irradiação UV (KAMARAN et al., 2010).

O interesse pelos compostos fenólicos encontrados em frutas e hortaliças, como em maçãs e seus produtos, tem aumentado, principalmente devido ao seu potencial antioxidante, o qual pode proporcionar benefícios à saúde (PAEPE et al., 2011) e propriedades sensoriais (adstringência, cor e sabor) aos produtos alimentícios (RENARD; DUPONT; GUILLERMIN, 2007). Estudos apresentam que compostos fenólicos podem ser úteis na redução dos riscos de

desenvolvimento de várias doenças, como Alzheimer, câncer e diabetes (BOYER; LIU, 2004; LINK; BALAGUER; GOEL, 2010; YASSIN et al., 2017).

O teor de compostos fenólicos totais (determinado pelo método de Folin-Ciocalteu) em maçãs comercializadas no Brasil pode variar entre 456 e 1583 mg/kg de catequina equivalente (ZARDO et al., 2015).

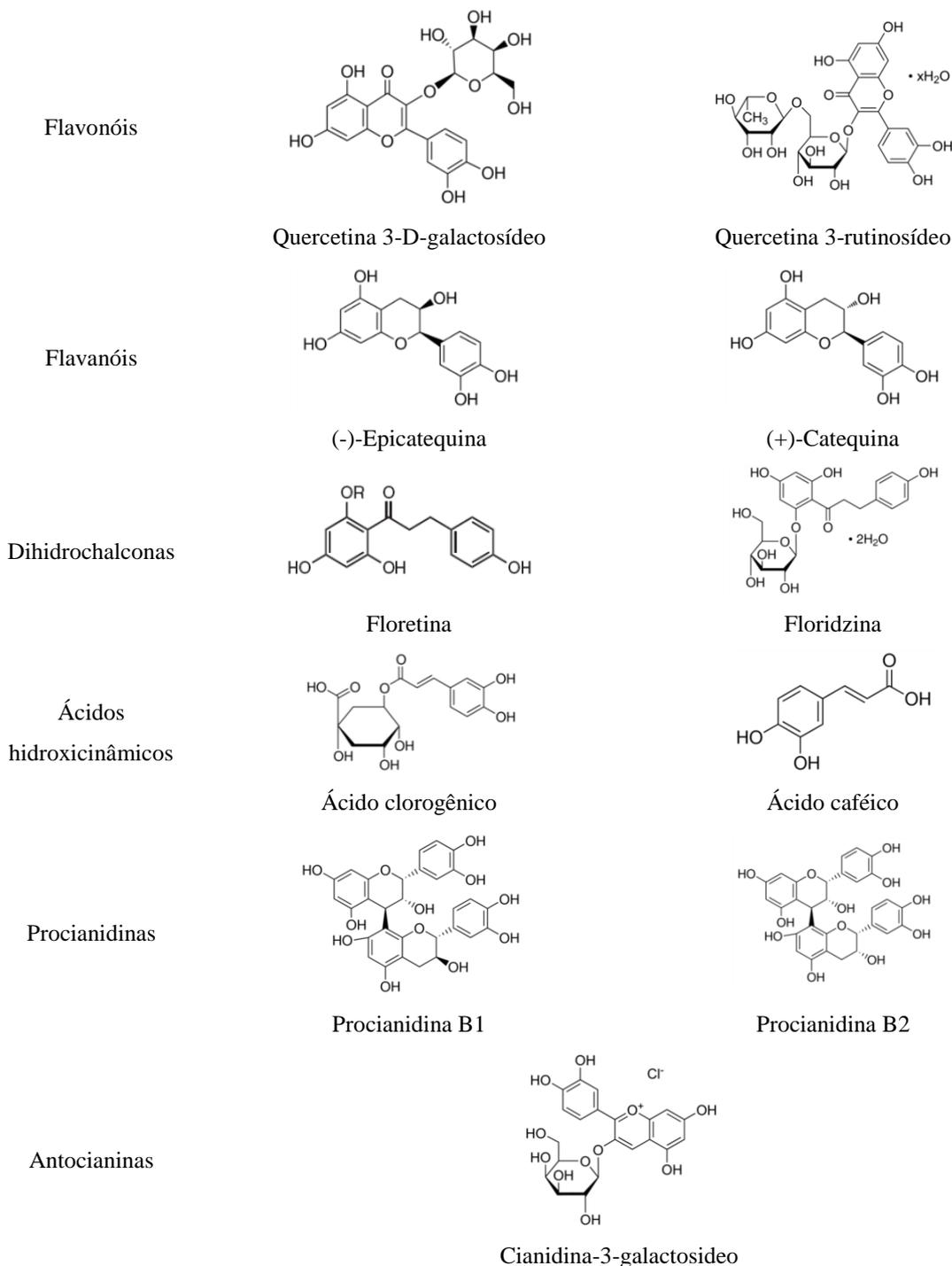


Figura 1.2: Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos encontrados em maçãs.  
Fonte: Adaptado de Kamaran et al. (2010).

As principais classes de compostos fenólicos encontrados em maçãs compreendem os flavonoides e os ácidos fenólicos (ZIELINSKI et al., 2014). As classes predominantes encontradas no mesocarpo (polpa) compreendem as procianidinas, os ácidos hidroxicinâmicos, os flavan-3-óis em formas monoméricas e as dihidrochalconas. Enquanto, no epicarpo (casca) encontram-se quase que exclusivamente os flavonóis e as antocianinas (RENARD; DUPONT; GUILLERMIN, 2007; DEVIC et al., 2010; ALBERTI et al., 2017). As estruturas dos principais compostos fenólicos encontrados em maçãs estão apresentadas na Figura 1.2.

Fenóis podem ser encontrados em diferentes concentrações em várias partes dos frutos de forma heterogênea (LE DEUN et al., 2015). Nas maçãs, a maior porcentagem de compostos fenólicos se encontra na casca (ALBERTI et al., 2017), a qual pode ser entre 3 e 10 vezes maior do que na polpa. Entretanto, este valor pode ser considerado baixo quando se compara a proporção casca:polpa (LATA; TRAMPCZYNSKA; PACZESNA, 2009; ALBERTI et al., 2017). Além disso, a variação da composição fenólica nos frutos pode ser atribuída a diversos fatores, tais como a cultivar, as partes do fruto que são submetidas à análise, a área de cultivo, origem dos frutos, a colheita e o tempo de colheita (KHANIZADEH et al., 2008; ZARDO et al., 2013; ZARDO et al., 2015).

Cerca de 97% dos compostos fenólicos, encontram-se protegidos em estruturas denominadas vacúolos (NICOLAS et al., 1994), os quais tendem ao rompimento durante os processos de moagem e prensagem, para obtenção de sucos/mostos. Entretanto, nem todos os vacúolos são rompidos nesse processo, permanecendo grande parte destes compostos retidos no bagaço. A Tabela 1.2 apresenta a variação da composição fenólica em derivados de maçã segundo a literatura.

As classes de compostos fenólicos presentes no bagaço de maçã são as mesmas encontradas nos frutos frescos, porém em concentrações diferentes, dependendo da composição do bagaço (BAI; ZHANG; REN, 2012). A recuperação destes compostos tem sido estudada por vários autores nos últimos anos (BUSHAN et al., 2008; REIS; RAI; ABU-GHANNAM, 2012; KAMMERER et al., 2014; CHANDRASEKAR et al., 2015). Portanto, a valorização deste subproduto como matéria-prima para obtenção de compostos fenólicos visa à obtenção de biomoléculas com alto valor agregado, que incorporadas como ingredientes funcionais em alimentos e bebidas tem o intuito de aumentar a atividade antioxidante.

Tabela 1.2: Variação da composição fenólica de derivados da maçã.

Composto fenólico	Suco /Mosto (mg/L)	Sidra (mg/L)	Bagaço (mg/kg)	Referência
Quercetina	-	-	46,70- 131,78	Suárez et al. (2010); Bai; Zhang; Ren (2012)
Querctina 3-rutinosídeo	2,14	1,84	211,00 - 477,00	Cetkovic et al. (2008); Ye; Yue; Yuan (2014)
(-)-Epicatequina	0,08 - 66,76	0,07 - 95,30	24,00 - 173,00	Veberic et al. (2005); Cetkovic et al. (2008); Nogueira et al. (2008); Karaman et al. (2010); Ye; Yue; Yuan(2014)
(+)-Catequina	9,00 - 115,00	24,37	17,00 - 127,00	Veberic et al. (2005); Cetkovic et al. (2008); Kamaran et al. (2010); Ye; Yue; Yuan (2014)
Floretina 2'-β-D-glucosídeo	0,52 - 29,00	5,98	7,00 - 380,05	Veberic et al. (2005); Cetkovic et al. (2008); Kamaran et al. (2010); Suárez et al. (2010); Zielinski et al. (2014); Ye; Yue; Yuan (2014)
Ácido 5-cumaroilquínico	9,00 - 226,00	0,00 - 8,27	2,84 - 176,00	Veberic et al. (2005); Cetkovic et al. (2008); Nogueira et al. (2008); Torres et al. (2011); Bai; Zhang; Ren (2012); Zielinski et al.(2014); Ye; Yue; Yuan (2014)
Ácidocafeico	3,00 - 79,00	4,20	0,13 - 87,00	Cetkovic et al. (2008); Karaman et al. (2010); Torres et al. (2011); Bai; Zhang; Ren (2012), Ye; Yue; Yuan (2014)
Procianidina B1	2,00 - 19,70	-	24,60	Oszmianski et al. (2011); Zielinski et al. (2014)
Procianidina B2	0,00 - 118,00	0,00 - 95,00	65,67 - 161,00	Nogueira et al. (2008); Suárez et al. (2010); Oszmianski et al. (2011); Zielinski et al. (2014)
Antocianinas totais	131,00 - 180,00	-	-	Erkan-Koç et al. (2015)
Fenóístotais (Folin-Ciocalteu)*	228,00 - 438,00	141,00 - 482,00	4220,00 - 8670,00	Cetkovic et al. (2008); Suaréz et al. (2010); Zielinski et al. (2014a); Zucoloto et al. (2015); Alberti et al. (2016)

Nota: - Valor não encontrado na literatura. \*: Valores expressos em catequina equivalente.

### 1.3.1 FLAVONOIDES

Os flavonoides apresentam estrutura formada por dois anéis aromáticos, denominados A e B, ligado por meio de uma cadeia carbônica que forma um terceiro anel oxigenado e heterocíclico, denominado anel C (Figura 1.3). A posição das hidroxilas dispostas nos anéis diferencia os compostos não somente em termos de estrutura, mas também de capacidade antioxidante.

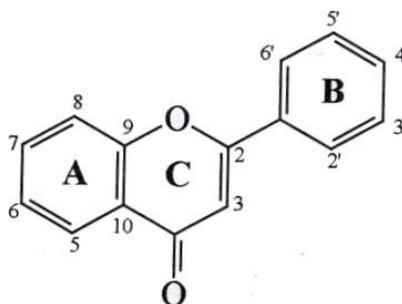


Figura 1.3: Estrutura básica de um flavonoide.  
Fonte: PubChem (2017).

Essa grande classe de compostos fenólicos foi estimada em 6000 compostos diferentes, provenientes de diferentes frutas e vegetais (BABU et al., 2013). Estes, podem ser subdivididos em subclasses como flavonóis, flavanóis, flavonas, flavononas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas. Entretanto, as principais subclasses encontradas em maçãs pertencem aos flavanóis, flavonóis e algumas chalconas. Entre os flavanóis, se destacam a catequina, epicatequina e procianidinas, enquanto que entre os flavonóis se destacam os glucosídeos de quercetina. A principal dihidrochalcona encontrada em maçãs, a floridzina, também é considerada um biomarcador, uma vez que é encontrada quase exclusivamente em maçãs e seus produtos (ALBERTI et al., 2017).

### 1.3.2 ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos compreendem a segunda classe mais abundante de fenóis nas maçãs (LE DEUN et al., 2015). Apresentam grupo funcional carboxila, o que os caracteriza como ácidos. Em geral, ácidos fenólicos são derivados do ácido quínico e podem ser subdivididos em duas subclasses: ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzoicos (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido cumárico

representam os principais ácidos fenólicos encontrados em maçãs e seus produtos. A esterificação do ácido quínico com um ácido trans-cinâmico (ácido cafeico, ferúlico, sinápico ou *p*-cumárico) forma o ácido clorogênico (OLIVEIRA; BASTOS, 2011), também considerado como principal substrato da polifenol oxidase (PPO), enzima que catalisa a reação de escurecimento enzimático. Basicamente, os monofenóis passam por uma hidroxilação que forma *o*-difenois. Na sequência, os *o*-difenois são oxidados, originando as *o*-quinonas, compostos escuros também conhecidos por melaninas. A oxidação dos ácidos fenólicos pode favorecer a reação com demais compostos presentes no meio (NICOLAS et al., 1994).

#### 1.4 RADICAIS LIVRES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres representam espécies químicas com um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; FERREIRA; MATSUBARA, 1997), caracterizando espécies reativas ao oxigênio (ROS). Esses radicais livres estão presentes no corpo humano e naturalmente fazem parte do metabolismo como mediadores da transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, como geração de energia (ATP), fertilização do óvulo, ativação de genes e participação nos mecanismos de defesa contra infecções. Porém, quando estão em quantidades excessivas podem gerar estresse oxidativo em células, e para combater isso, o organismo produz antioxidantes como mecanismo de defesa (BARBOSA et al., 2010).

Os antioxidantes podem ser caracterizados por substâncias naturais ou artificiais que apresentam capacidade de prevenir ou retardar danos causados pelo estresse oxidativo nas células (APAK et al., 2016a). Quimicamente, podem ser descritos por compostos capazes de doar hidrogênio e/ou transferir elétrons (CRAFT et al., 2012). Tanto animais quanto vegetais produzem antioxidantes como mecanismo de defesa a reações adversas.

Em condições normais os danos gerados pelo estresse oxidativo são mínimos, uma vez que o próprio organismo apresenta mecanismos de defesa. Entretanto, quando há um desbalanço na quantidade de ROS e antioxidantes, pode ocorrer oxidação de biomoléculas, perdendo sua função biológica e/ou gerando desequilíbrio homeostático, o qual atinge células e tecidos (BARBOSA et al., 2010). As principais biomoléculas susceptíveis a oxidação por ROS são lipídios e proteínas do DNA, as quais supostamente são potenciais causadores do envelhecimento precoce, doenças coronárias e câncer (BENZIE; STRAIN, 1996). Uma das

formas de evitar este desbalanço é a ingestão de alimentos que contenham compostos com atividade antioxidante, como é o exemplo dos compostos fenólicos encontrados em vegetais.

A atividade antioxidante é uma forma de mensurar a capacidade de um composto reduzir radicais livres, evitando a propagação de reações de oxidação, e quelar íons metálicos. Esta medida é positivamente correlacionada à composição fenólica total (ZARDO et al., 2015; ZUCOLOTO et al., 2015).

Os produtos de maçãs, bem como a fruta *in natura*, como mencionado anteriormente apresentam quantidades de compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante. Cada composto fenólico apresenta uma atividade antioxidante diferente (Tabela 1.3), devido à conformação de sua molécula.

Tabela 1.3: Atividade antioxidante de compostos fenólicos determinada por diferentes métodos.

Composto fenólico	Método de Atividade Antioxidante		
	ABTS*	FRAP*	CUPRAC*
Ácido ascórbico	1,02	-	1,14
Ácido 5-cafeoilquínico	0,98	8,38	3,15
Ácido gálico	2,52	-	2,99
Sirigina	-	4,53	-
Procianidina B2	-	9,11	7,11
Ácido cafeico	1,05	5,19	3,12
Ácido cinâmico	-	2,32	-
Floridzina	0,12	1,13	1,47
Quercetina 3-β-D- glucosídeo	-	-	3,54
Quercetina	2,89	7,25	4,64
Quercetina 3-D-xilosídeo	-	7,63	-
(+)-Catequina	1,44	-	3,46
Quercetina 3-rutinosídeo	0,93	-	3,24
Referência	Kamaran et al. (2010) Bai; Zhang; Ren (2012) Kamaran et al. (2010)		

Nota: \*: micromol de trolox equivalente por quilograma ( $\mu\text{mol TE/kg}$ ). FRAP: determinação da atividade antioxidante pela redução do íon férrico; ABTS: determinação da atividade antioxidante pela descoloração do cátion ABTS (ácido 2,2- azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6- sulfônico); CUPRAC: determinação da atividade antioxidante pela redução do cobre; - valor não determinado.

A principal forma de mensurar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos em alimentos são os métodos químicos ou também denominados *in vitro*. A maioria deles apresenta o mesmo princípio, com compostos sintéticos, os quais podem ser tanto um radical colorido ou um composto redox-ativo, monitorando a eliminação do radical ou redução do composto redox-ativo, por meio da absorbância obtida da leitura em espectrofotômetro

(FLOEGEL et al., 2011). A atividade antioxidante pode ser então determinada por meio de uma curva de calibração do método, determinada a partir de um padrão de concentração conhecida.

Alguns métodos de determinação de atividade, tais como parâmetros de aprisionamento do radical peroxil total (TRAP), capacidade de absorvância do radical oxigênio (ORAC) e capacidade de captura de oxiradical total (TOSC) antioxidante atuam com transferência de um átomo de hidrogênio (HAT), ou seja, estes compostos medem a capacidade de um antioxidante eliminar os ROS por meio da doação de um átomo de hidrogênio, enquanto que outros métodos como a captura do radical DPPH e descoloração do cátion ABTS mensuram a capacidade antioxidante de um composto antioxidante principalmente por meio da transferência de elétron (ET), podendo também atuar como doadores de hidrogênio (APAK et al., 2016a, APAK et al., 2016b).

Os métodos que serão aplicados para determinar a atividade antioxidante das sidras neste estudo incluem a captura do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995); a redução do íon férrico, pelo método de FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996); pela descoloração do cátion ABTS (RE et al., 1999) e; pela redução do cobre, CUPRAC (APAK et al., 2008). Há uma dificuldade de interpretar mecanismos e os padrões de reatividade de alguns métodos, devido à falta de informação das estruturas dos antioxidantes testados (APAK et al., 2016b). Esses métodos não resultam igualmente na mesma medida de capacidade antioxidante de um composto, por esse motivo essa determinação não deve ser realizada apenas por um único método (CAMPOS et al., 2009).

## 1.5 ANÁLISE SENSORIAL

Por definição, a análise sensorial é uma ciência usada para medir características de produtos (alimentos, bebidas, cosméticos e até mesmo materiais), percebidas pelos sentidos humanos (ROSSINI et al., 2012). Atrelados, os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais podem dizer a respeito da qualidade de um produto (DUTCOSKY, 2015). Além disso, a análise sensorial pode ser utilizada para avaliar a expectativa, aceitação e intenção de compra do consumidor frente a determinado produto.

Todos os sentidos (paladar, olfato, tato, visão e audição) são utilizados para avaliação sensorial de um produto. Entretanto, por vezes um desses pode ser reprimido, como por exemplo, quando se utilizam lâmpadas coloridas para mascarar a diferença de cor das amostras durante uma avaliação.

Os métodos sensoriais podem ser classificados de duas maneiras: afetivos discriminativos ou descritivos. Testes discriminativos indicam diferenças ou não de duas amostras que estão sendo analisadas, enquanto que testes descritivos caracterizam uma amostra, semelhante a uma análise química, o que permite a utilização de ferramentas estatísticas para analisar os resultados (TESFAYE et al., 2009).

A análise sensorial realizada com julgadores treinados possibilita melhores resultados. O tempo de treinamento e a maneira como se conduz a análise dependem das características do produto e das variáveis utilizadas (DUTCOSKY, 2015). A seleção dos julgadores pode ser realizada por meio de questionários e ou entrevistas, os quais auxiliam na avaliação do perfil de cada um. Porém, a seleção de julgadores familiarizados com o tipo de amostra permite reduzir o tempo de treinamento.

A análise sensorial de produtos como vinagres por exemplo, exige uso de painel julgadores treinados, pois o produto apresenta pungência, atributo que pode ser incomodo para alguns julgadores (TESFAYE et al., 2009). No caso de sidras secas, bebidas que podem apresentar acidez, amargor e adstringência, também se faz necessário treinar os julgadores.

No planejamento de painéis sensoriais, a determinação dos atributos a serem avaliados compreende de grande importância (ROSSINI et al., 2012). Em sidras, os principais atributos identificados pela maioria dos julgadores compreendem odor, doçura, acidez, amargor e adstringência (SYMONEAUX et al., 2014). A interação harmoniosa entre estes atributos compõe o *flavor*, sensação identificada na via retro nasal. A composição físico-química (açúcar, acidez, etanol e polifenóis) da sidra influencia diretamente na percepção sensorial da mesma, entretanto, poucos estudos na área de sidras correlacionam a qualidade físico-química com a sensorial (SYMONEAUX et al., 2015).

Os polifenóis apresentam grande importância nas características sensoriais do produto, podendo influenciar na cor, amargor e adstringência dos produtos. Malec et al. (2016) observaram relação entre a composição fenólica e a cor de sidras. De acordo com Symoneux et al. (2014), a presença de procianidinas em concentração acima de 750 mg/L influencia diretamente nos atributos de adstringência e amargor das sidras, porém não apresenta relação direta com doçura e acidez.

Odor caracteriza importante atributo, pois remete a qualidade das sidras. Trata-se de uma mistura complexa de compostos voláteis, provenientes da fruta e/ou formados no decorrer da fermentação. Os principais aromas descritos em sidras são caracterizados como frutado, floral, ácido, aceto balsâmico, baunilha (MADRERA et al., 2010).

As sidras podem ser adoçadas (BRASIL, 2009), o que favorece a doçura deste produto. Além disso, como mencionado, algumas sidras podem apresentar residual de açúcares ao final da fermentação (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012), o que também contribui para a sua qualidade sensorial.

Como apresentado, a utilização do bagaço de maçã imobilizado durante a fermentação da sidra pode melhorar a qualidade desta bebida. A quantidade de compostos fenólicos pode ser aumentada por meio da extração desses compostos presentes no bagaço, o que influencia diretamente na atividade antioxidante dos produtos. Dessa forma, compostos encontrados quase exclusivamente na casca das maçãs, principal fração da fruta que compõem o bagaço, podem ser adicionados ao produto final. Além disso, características sensoriais, como cor, amargor, acidez, adstringência, bem como qualidade do odor também podem ser aprimoradas. Portanto, a utilização deste subproduto pode ser uma alternativa para o aproveitamento desses compostos.

## **CAPÍTULO 2**

### **EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SIDRA COM BAGAÇO IMOBILIZADO**

## **Evolução dos compostos fenólicos durante a fermentação da sidra com bagaço imobilizado**

### **Resumo**

O bagaço de maçã, subproduto da fabricação de sucos e mostos, contém fibras e açúcares, além de uma quantidade interessante de compostos bioativos, os quais conferem atividade antioxidante. Este subproduto apresenta potencial para ser utilizado na obtenção de alimentos e bebidas adicionados de fibras e/ou compostos fenólicos. Dessa forma, o objetivo deste capítulo foi avaliar a evolução dos compostos fenólicos provenientes do bagaço imobilizado durante a fermentação de sidras, além de verificar a influência desta extração na qualidade sensorial dessas bebidas. As maçãs (cv. Fuji) foram processadas e o mosto foi fermentado com cepa de *S. cerevisiae* por 15 dias. Foram utilizados 20 fermentadores contendo 200 mL de mosto, os quais foram separados em dois grupos, sendo que um deles controle (sidra I) e o outro, adicionado de bagaço imobilizado (sidra II). A fermentação foi acompanhada por meio de análises de composição fenólica (total e individual por CLAE), atividade antioxidante *in vitro*, cor, composição de açúcares e etanol realizadas nos 1º, 4º, 7º, 11º e 15º dias de fermentação. Além disso, foi realizada a análise sensorial do produto final, com 8 julgadores conhecedores do produto, utilizando uma escala estruturada para atributos de cor, acidez, amargor, adstringência e qualidade do odor. A composição fenólica decresceu durante a fermentação da sidra I, enquanto que, na Sidra II, a extração de fenóis do bagaço aumentou esse parâmetro, o que também influenciou na atividade antioxidante. A quantidade de glucose e frutose na sidra II aumentou até o quarto dia de fermentação, devido a extração desses compostos do bagaço, o que influenciou na produção de etanol. A cor das sidras I e II foi descrita como amarelas, e de luminosidade alta ( $L > 90$ ), entretanto a sidra II apresentou maior luminosidade. Os flavonóides, principalmente flavonóis (quercetina 3-rutinosídeo, quercetina 3-D-galactosídeo, quercetina 3- $\beta$ -D glucosídeo, quercetina 3-D xilosídeo, quercetina O- $\alpha$ -L arabinofuranosídeo e quercetina 3-O raminosídeo), foram os principais compostos extraídos durante a fermentação. Segundo a análise sensorial, a sidra II foi mais clara, mais amarga e menos ácida, ao passo que a adstringência foi igual para ambas as sidras. A qualidade do odor, avaliada por método afetivo, apresentou notas entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente” para ambas sidras. Portanto, a utilização do bagaço imobilizado no decorrer da fermentação aumenta a composição fenólica de sidras, bem como a atividade antioxidante, e melhora a sidra em termos de qualidade sensorial.

**Palavras-chave:** atividade antioxidante, CLAE, flavonoides.

## Abstract

The apple pomace, by-product of juices and musts making, have fibers and sugars, further a great amount of bioactive compounds, which confer antioxidant activity. This by-product shows potential to be used in the getting of foods and beverages added with fibers and phenolic compounds. The use of apple pomace during the fermentation of ciders can permit the extraction of phenolic compounds, which potentialize the antioxidant activity of these beverages. Therefore, the aim of this chapter was to evaluate the evolution of the phenolic compounds from immobilized apple pomace during the ciders fermentation, in addition to verify their influence on sensory quality of the ciders. The apples (cv. Fuji) were processed and the must was fermented with *S. cerevisiae* for 15 days. It was used 20 fermenters with 200 mL of must, which were separated in 2 groups, being one of them the control (cider I) and the other, added with apple pomace immobilized (cider II). The fermentation was accompanied by analysis of phenolic composition (total and individual by HPLC), antioxidant activity, cor, sugar and ethanol content carried out in the 1<sup>st</sup>, 4<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days of fermentation. Furthermore, it was carried out sensory analysis of the final product, with 8 judges that knew about ciders, using structured scale to the attributes of color, sourness, bitterness, astringency and odor quality. The phenolic composition decreased during the fermentation of cider I, whereas, on cider II, the extraction of phenols from apple pomace increased this parameter, which also influenced on antioxidant activity. The glucose and fructose contents on cider II increased until 4<sup>th</sup> day of fermentation, due the extraction of these compounds from apple pomace, which influenced on increasing of ethanol production. The color of the ciders was described as yellow, and high lightness ( $L > 90$ ), however, cider II showed higher lightness than cider I. The flavonoids, mainly flavonols (quercetin 3-rutinoside, quercetin 3-D-galactoside, quercetin 3- $\beta$ -D glucoside, quercetin 3-D xyloside, quercetin O- $\alpha$ -L arabinofuranoside and quercetina 3-O rhaminoside), were the main compounds extracted during the fermentation. Second the sensory analysis, the cider II were lightest, more bitter and less sour, whereas the astringency was equal for both ciders. the odor quality, evaluated by affective method, showed notes between “I liked quickly” and “I liked moderately” for both ciders. Therefore, the use of immobilized apple pomace during the fermentation increases the phenolic composition of ciders, as well as the antioxidant activity and improve the cider in terms of sensorial quality.

**Keywords:** antioxidant activity, HPLC, flavonoids.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Maçãs e seus produtos têm despertado interesse tanto para indústria de alimentos e bebidas quanto para os consumidores em virtude da sua composição química. Os compostos fenólicos presentes nos produtos da maçã conferem atividade antioxidante (CRAFT et al., 2012; ALBERTI et al., 2016; ALVAREZ et al., 2017) e podem melhorar aspectos sensoriais (SYMONEAUX et al., 2014; MALEC et al., 2014). Esta atividade biológica é responsável por inibir certas reações no organismo humano, entre elas redução da taxa de envelhecimento, o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BLUMBERG et al., 2015), depressão (PATHAK et al., 2013), vários tipos de câncer (BOYER; LIU, 2004, LINK; BALAGUER; BOEL, 2004) e diabetes (YASSIN et al., 2017).

O suco de maçã e as sidras são os principais produtos desta agroindústria. A prensagem de maçãs visando à obtenção destes produtos gera o bagaço, principal subproduto. Por ser composto por partes da fruta, o bagaço de maçã apresenta as mesmas classes de compostos fenólicos da matéria-prima. Entretanto, sua concentração pode variar em função da proporção das partes das maçãs (LE DEUN et al., 2015; ALBERTI et al., 2017), e pelo escurecimento enzimático que causa a oxidação de parte destes compostos, o qual ocorre logo no início da trituração das frutas (YE; YUE; YUAN, 2014). A principal fração que compõe o bagaço, o epicarpo (casca), contém importantes classes dos compostos fenólicos, destacando-se os flavonóis (quercetinas glicosiladas), pouco extraídos para o mosto durante a prensagem (ALVAREZ et al., 2017; MADRERA et al., 2017). Além disso, outras classes de compostos como as dihidrochalconas (floretilina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo), os flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e procianidinas) e os ácidos fenólicos (ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico) também podem ser encontrados em diferentes proporções (BAI; ZHANG; REN, 2012; PAMAR; SHARMA; VASANTHA-RUPASHINGHE, 2015; MADRERA et al., 2017).

Apesar do bagaço de maçã conter grande quantidade de compostos bioativos (por exemplo: (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido 5-cafeoilquínico, floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo e quercetinas glicosiladas), este é subvalorizado pelas indústrias (SATO et al., 2010). O destino deste material geralmente é inadequado, sendo depositado diretamente no solo para adubação orgânica ou na alimentação de animais (BUSHAN et al., 2008). Essas práticas podem trazer sérias consequências, como a poluição do meio ambiente e prejuízos a saúde dos animais. No entanto, o bagaço de maçã pode ser utilizado para enriquecer alimentos e bebidas, como

biscoitos a base de arroz integral (MIR et al., 2017), e de bebidas como aguardente (MADRERA et al., 2013).

Na produção de vinhos, as cascas das uvas são submetidas a fermentação juntamente com o mosto, o que consiste em um processo denominado maceração. Este processo visa à extração de compostos fenólicos, os quais podem influenciar nas características do produto final (OLEJAR; FEDRIZZI; KILMARTIN, 2015a, 2015b, 2016; LUKIC; LOTTI; VHROVSEK, 2017). Da mesma forma, a utilização do bagaço de maçã imobilizado durante a fermentação das sidras pode aumentar a concentração de compostos fenólicos na bebida. Portanto, o objetivo deste capítulo foi avaliar a evolução dos compostos fenólicos provenientes do bagaço imobilizado durante a fermentação de sidras e sua influência na qualidade sensorial de sidras.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 MATERIAIS

As maçãs (cv. Fuji) foram adquiridas no comércio local de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (25 ° 05 ' 42 " S 50 ° 09 ' 43" O). Os reagentes de Folin-Ciocalteu usado para determinação da composição fenólica total, TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina) usado para determinação da atividade antioxidante pelo método de FRAP, bem como os solventes metanol, acetona, ácido acético e acetonitrila, e o padrão Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- carboxílico) usado para determinação das curvas de atividade antioxidante, foram adquiridos da JT Baker (EUA). Os reagentes: neocuproína (2,9-Dimetil-1,10-fenantrolina hidratado) utilizado para determinação da atividade antioxidante pelo método de CUPRAC, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS (ácido 2,2- azino-bis-3- etil-benzotiazolina-6- sulfônico), e os padrões de ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, floretina-2'-β-D- glucosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3-β-D- glucosídeo, quercetina-3-O-raminosídeo, quercetina-3-α-L-arabinofuranosídeo, quercetina-3- rutinosídeo, utilizados para determinação da composição fenólica individual, bem como sacarose, *D*-glucose, *D*-frutose usado para determinação de açúcares foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Etanol usado como solvente foi obtido da empresa Merck (Brasil). Água deionizada e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Brasil) foram usadas no preparo de soluções.

### 2.2.2 PROCESSAMENTO DO MOSTO E OBTENÇÃO DOS BAGAÇOS

O processamento do mosto (Figura 2.1) iniciou com a seleção das maçãs, retirando as frutas inadequadas para o processamento (frutas com podridões). As maçãs selecionadas foram higienizadas em água corrente para retirada superficial de sujidades e em seguida, imersas em solução de cloro a 200 mg/L durante 10 min (GOMES et al., 2014). Na sequência, as maçãs foram trituradas (Processador Metvisa, Tipo MPA) e então acondicionadas em telas plásticas (polietileno) e submetidas à prensagem de 3 kgf/cm<sup>2</sup> (Prensa Hidráulica Eureka, Hoppe, Ind. Ltda., Brasil) por 5 min, obtendo o mosto bruto de maçã. O qual foi adicionado de enzima pectinolítica (PECTINEX 3XL, Novozymes do Brasil, pH ótimo 3,5) na proporção de 3mL/hL, sendo mantido a 45°C por 1 h. Na sequência, o mosto foi trasfegado, com auxílio

de uma mangueira devidamente higienizada, obtendo uma fração mais límpida. Esse mosto foi congelado  $-18^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização na fermentação da sidra.

O bagaço, subproduto obtido do processamento, foi recuperado para a utilização durante a fermentação das sidras. Para isso, foi submetido à desidratação em estufa com circulação de ar (Marca MARCONI, Modelo MA035/5, Piracicaba, SP, Brasil) em temperatura ao redor de  $60^{\circ}\text{C}$ , até atingir massa constante. O bagaço desidratado foi triturado em moinho de facas (Marca IKA WERKE, Modelo M20, EUA), e peneirado a fim de obter a fração retida entre 40 e 20 Mesh (0,42 e 0,82 mm). Ambos os produtos foram usados nas posteriores etapas descritas a seguir:

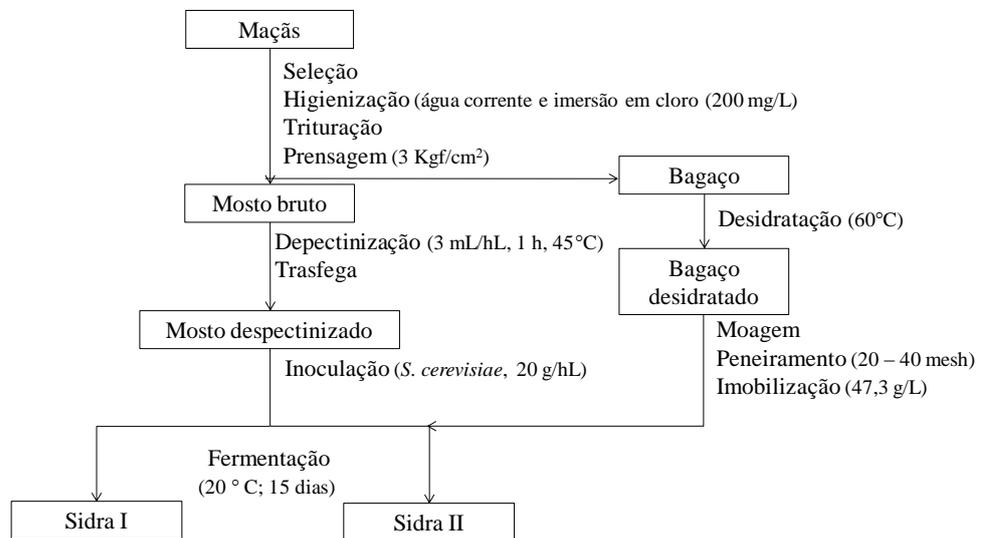


Figura 2.1: Fluxograma do processamento das Sidras.  
Fonte: Adaptado de Nogueira et al. (2003); Nogueira; Wosiacki (2012).

### 2.2.3 FERMENTAÇÃO DAS SIDRAS

Conforme apresentado na Figura 2.1, o mosto foi dividido em duas frações para fermentação, sendo uma delas adicionada de bagaço imobilizado (sidra II) e a outra, sem adição como sidra controle (sidra I). A fermentação das sidras foi realizada em fermentadores (erlenmeyers de 250 mL), munidos de batoque (Figura 2.2). Em cada fermentador foram adicionados 200 mL de mosto. Previamente ao inóculo, as leveduras na forma seca ativa (*Saccharomyces cerevisiae*, Fermol Reims Champagne, Ref. PD 2002 AEB Group, San Polo, Brescia, Itália) foram pesadas na concentração de 20 g/hL ( $1$  a  $2 \times 10^6$  UFC/mL) e

adicionadas de 10 mL de mosto, para sua rehidratação, sendo após 15 min, adicionadas aos 190 mL de mosto.

A imobilização do bagaço (Figura 2.2) foi realizada por meio do seu acondicionamento em sachês confeccionados com tecido sintético (*voil* branco), previamente fervidos durante 30 min, na proporção de 47,3 g de bagaço para 1 L de mosto, quantidade determinada em experimentos prévios (NOGUEIRA et al., 2011), a qual corresponde a quantidade média de bagaço produzido (em matéria seca) na produção de um litro de mosto. Foram utilizadas esferas de vidro para manter o sachê imerso no mosto. A fermentação ocorreu por aproximadamente 15 dias à temperatura de  $20 \pm 1$  °C, em câmara incubadora (BOD Labor, SP – 500, Presidente Prudente, SP, Brasil).

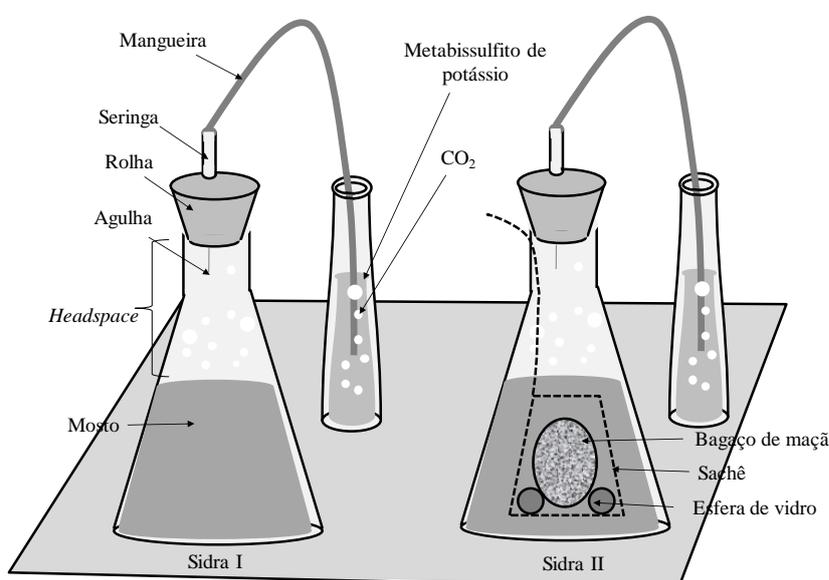


Figura 2.2: Desenho dos fermentadores das sidras I e II.  
Fonte: O Autor.

#### 2.2.4 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

A quantidade de CO<sub>2</sub> produzida foi monitorada por meio da perda de massa dos fermentadores, a qual foi mensurada de três a cinco vezes ao dia, por aproximadamente 15 dias. Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir de uma equação polinomial, obtida em um gráfico tempo vs. perda de massa de CO<sub>2</sub>, a qual foi ajustada para quarta ordem.

#### 2.2.5 EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A evolução dos compostos fenólicos foi estudada em 20 fermentadores, os quais foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de processamento: sidra I, sem adição de bagaço; e sidra II com adição de bagaço imobilizado. A fermentação dessas sidras foi interrompida, em duplicata para cada grupo (Figura 2.3), em tempos diferentes da fermentação (1°, 4°, 7°, 11° e 15° dias). Ao interromper a fermentação, as amostras foram submetidas a contagem de leveduras, centrifugadas e posteriormente congeladas até a realização das demais análises. Os bagaços das sidras II foram secos novamente em estufas (60 °C, até peso constante) e então submetidos as análises.

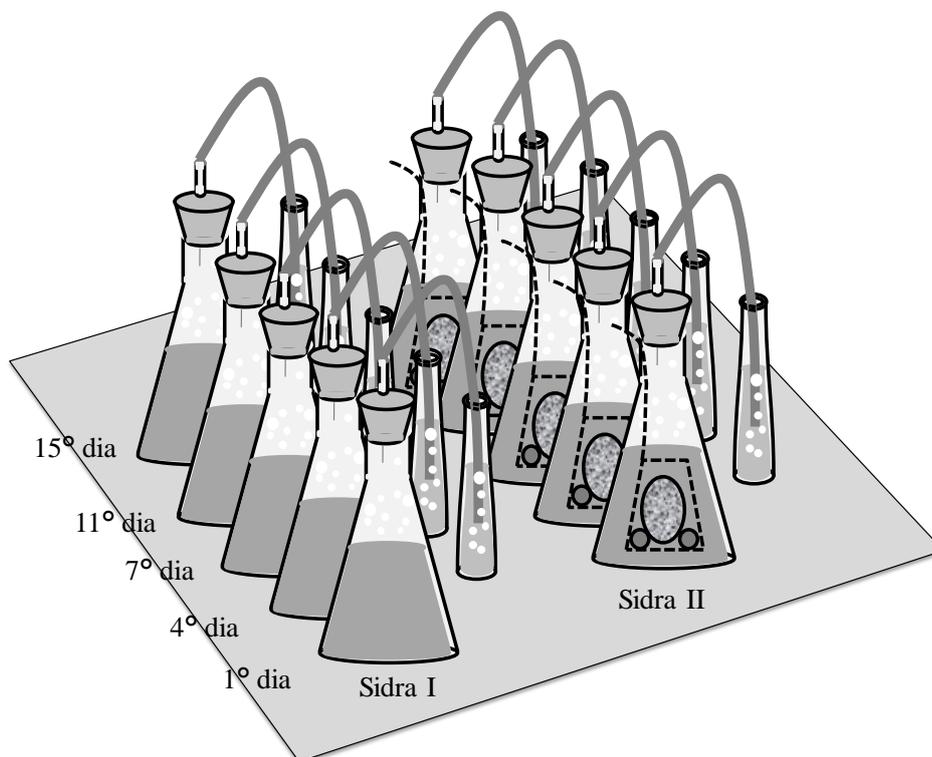


Figura 2.3: Fermentação das sidras para análise da evolução dos compostos fenólicos.  
Fonte: O Autor.

## 2.2.6 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO PARA ANÁLISES

Com o intuito de verificar a quantidade de compostos fenólicos extraídos do bagaço durante a fermentação, foram analisados os extratos fenólicos do bagaço *in natura* (não fermentado) e dos bagaços que foram submetidos à fermentação. Para tanto, após o período final de fermentação, o bagaço foi recuperado e desidratado a 60°C, sendo em seguida moído manualmente e tamisado entre 40 e 20 mesh (0,420 a 0,841 mm). Na sequência, ambos os bagaços desidratados, foram submetidos a duas extrações consecutivas em metanol (84,5% v/v) e acetona (65% v/v), conforme descrito por Alberti et al. (2014).

## 2.2.7 CARACTERIZAÇÃO DAS SIDRAS E DOS BAGAÇOS DE MAÇÃ

### 2.2.7.1 ANÁLISES COLORIMÉTRICAS

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados pelo método de Singleton e Rossi (1965), com modificações. Em tubos, foram adicionados 8,4 mL de água, 0,5 µL da amostra previamente diluída e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (0,20 N), sendo agitada em agitador para tubos (Vision Scientific, Modelo KMC – 1300 V). Após 3 min, foi adicionado 1 mL da solução de carbonato de cálcio saturada, sendo agitados novamente e mantidos no escuro por 1 h para a completa reação. Então, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Modelo Mini UV, 1240, Shimadzu, Japão) a 765 nm, e os resultados foram expressos em mg de ácido 5-cafeoilquínico por litro de mosto ou sidra ou kg de bagaço desidratado (mg ACF/L ou mg ACF/L), calculado por meio da curva de calibração [CFT = 1597,1 x absorbância – 1,2887;  $R^2 = 0,993$ ].

A concentração dos flavonoides totais (FT) foi determinada segundo Herald; Gadgil e Tilley (2012). Em tubos de ensaio foram adicionados 250 µL da amostra previamente diluída, 2 mL de água deionizada e 120 µL de nitrito de sódio (0,5 mol/L). Então, os tubos foram agitados e mantidos em repouso durante 5 min. Na sequência, foram adicionados 120 µL de cloreto de alumínio (10% m/v), sendo novamente agitados e mantidos em repouso por 5 min. Por fim, foram adicionados 800 µL de hidróxido de sódio (1 mol/L), agitados e submetidos a leitura em espectrofotômetro a 510 nm. A curva padrão de (+)-catequina foi plotada [FT = 418,62 x absorbância - 72,981;  $R^2 = 0,998$ ], e os resultados expressos em miligrama de (+)-catequina equivalente por litro de mosto/sidra ou quilograma de bagaço (mg CAT/L ou mg CAT/kg).

A determinação dos flavanóis totais (FLA) foi realizada de acordo com a metodologia de Broadhurst e Jones (1978). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,25 mL da amostra diluída quando necessário, 1,25 mL de solução de vanilina (4% em metanol, m/v) e 0,75 mL de ácido clorídrico P.A. (HCl). Os tubos foram mantidos em ausência de luz durante 15 min para a reação completa. Então, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 500 nm. A curva de calibração de (+)-catequina foi plotada [FLA = 610,72 x absorbância – 5,7511;  $R^2 = 0,998$ ] e os resultados expressos em miligramas de (+)-catequina equivalente por litro ou quilograma (mg CAT/L ou mg CAT/kg).

A análise de atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH, foi realizada de acordo com Brand-Williams et al. (1995), com poucas modificações. Em que, 0,05 mL de cada amostra (sem diluição) foram dispostas em tubos de ensaio com 1,95 mL do reagente DPPH (125  $\mu\text{mol/L}$ ). As misturas foram agitadas e deixadas reagindo por 30 min, no escuro. Na sequência, as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro a 517 nm. A curva padrão [DPPH = 3,558 x absorvância;  $R^2 = 0,996$ ] foi determinada a partir do padrão trolox.

O método ABTS também foi utilizado para determinar o sequestro dos radicais livres conforme proposto por Re et al. (1999) e modificado por Alvarez et al. (2017). Primeiramente, a solução do radical ABTS<sup>+</sup> foi preparada com a mistura de 3 mL da solução ABTS (7 mmol/L) com 3 mL da solução de persulfato de potássio (2,45 mmol/L), deixando reagir por 16 h na ausência de luz. Após este período, 4 mL da mistura foram diluídos em 250 mL de água. Então, a solução de ABTS teve a sua absorvância corrigida para uma absorvância próxima a 0,70 (734 nm). Assim, em tubos foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da amostra e 1,4 mL da solução de ABTS. A reação foi deixada reagir por 30 min na ausência de luz, sendo posteriormente submetidas à leitura da absorvância em espectrofotômetro a 734 nm. A curva de calibração [ABTS = 5,290 x absorvância;  $R^2 = 0,997$ ] foi determinada a partir do padrão Trolox.

A atividade antioxidante total foi medido pelo método FRAP segundo a metodologia de Benzie e Strain (1996), com modificações propostas por Alvarez et al. (2017). Os antioxidantes presentes na amostra reduzem o íon  $\text{Fe}^{3+}$ , o qual passa a  $\text{Fe}^{2+}$ , que apresenta coloração azul devido a sua interação com o reagente TPTZ. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,05 mL das amostras e 1,5 mL do reagente de FRAP e agitados por 5 min. A reação ocorreu durante 30 min no escuro, sendo por fim submetidas a leitura em espectrofotômetro a 593 nm. O padrão trolox foi utilizado para o desenvolvimento da curva de calibração [FRAP = 1114 x absorvância;  $R^2 = 0,991$ ].

A atividade antioxidante pela redução do cobre (CUPRAC) foi determinada segundo Apak et al. (2008), com mínimas modificações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da amostra diluída ou do padrão trolox previamente diluídos e 1 mL de cada uma das seguintes soluções:  $\text{CuCl}_2$  ( $1 \cdot 10^{-2}$  mol/L), solução alcoólica de neocuproína ( $7,5 \cdot 10^{-3}$  mol/L), solução tampão de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (1 mol/L a pH 7.0), e água destilada, completando o volume final de 4,1 mL. O branco foi realizado substituindo a amostra por água ultrapura. A reação ocorreu durante 30 min na ausência de luz. A leitura da absorvância foi realizada em

espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. A curva padrão [CUPRAC = 4691,8 x absorvância - 72,981;  $R^2 = 0,991$ ] foi obtida a partir do padrão trolox.

Os resultados de atividade antioxidante *in vitro* foram expressos em micromol de Trolox equivalente por litro ou quilograma de amostra ( $\mu\text{mol TE/L}$  ou  $\mu\text{mol TE/kg}$ ).

A análise de cor foi realizada em colorímetro (Konica Minolta, Modelo CM-5, Japão), o qual fornece os parâmetros de  $L^*$  (luminosidade) variando de 0 (preto) a 100 (branco);  $a^*$ , que varia de verde (-60) a vermelho (+60); e  $b^*$  que varia de azul (-60) a amarelo (+60). A cromaticidade ( $C^*$ ), o ângulo *hue* (h) e a diferença total da cor ( $\Delta E$ ) foram determinados por meio das seguintes equações:

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

$$h = \left( \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \right) \quad 2)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad 3)$$

Os resultados do ângulo *hue* ( $h^\circ$ ) que ficaram abaixo de zero foram somados a  $180^\circ$ .

#### 2.2.7.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A acidez do mosto e dos fermentados foi realizada segundo a metodologia da AOAC (2005). Em erlenmeyers, foram adicionados 5 mL das amostras e gotas de fenolftaleína e completados para 50 mL de água deionizada. Então, a mistura foi titulada com hidróxido de sódio (0,1 N) até o ponto de viragem (pH 8,5).

A quantidade de nitrogênio total foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2005).

O pH do mosto e das sidras foi mensurado através de pHmetro portátil (Marca Tecnal, Modelo Tec-3MP, Piracicaba, São Paulo, Brasil) previamente calibrado com tampões 7,0 e 4,0.

#### 2.2.7.3 ANÁLISES INSTRUMENTAIS

A análise de açúcares (frutose, glucose e sacarose), etanol e sorbitol foi realizada segundo Zielinski et al. (2014), com poucas modificações. As amostras foram primeiramente diluídas 1:10 (mL/mL) com água ultrapura (Milli-Q, Milipore, Brasil). Na seqüência, as amostras foram filtradas em filtro seringa de 0,20  $\mu\text{m}$  (Nylon, Macherey-Nagel, Düren,

Germany). O volume de injeção da amostra foi de 10  $\mu$ L. A coluna Sugar Pak<sup>TM</sup>1 (300 x 6,5 mm) foi mantida a 80°C, com fluxo de 0,5 mL/min da solução de cloreto de cálcio (0,0016 mg/L), em condição isocrática. A detecção dos picos foi realizada em detector com índice de refração (Waters, Modelo 2414, Miliford, MA, EUA) a 50°C, por comparação do tempo de retenção dos padrões de açúcares e álcool (APÊNDICE A).

A determinação dos compostos fenólicos individuais foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Alberti et al. (2016). Em que, 10 mL das amostras foram centrifugados durante 20 min, 8500 x g, a 4°C (Hitachi Himac CR21GII, Toquio, Japão), ultracongelados a -40°C (Ultrafreezer NUAIRE, Modelo NU-9668GC, MN, EUA) e liofilizadas (Liofilizador Terroni, Modelo LS 3000, SP, Brasil). Na sequência, os liofilizados foram dissolvidos com 2 mL de solução de metanol (99,9%) e ácido acético (2,5%) (1:3 v/v). Dessa forma, as amostras foram concentradas 5 vezes, possibilitando a detecção e quantificação de compostos em menores quantidades. As amostras dissolvidas foram filtradas em filtro seringa de 0,20  $\mu$ m (Nylon, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) antes da análise. A fase móvel consistiu em ácido acético 2,5% (A) e acetonitrila (B), em gradiente variando de 3-9% de B (0-5 min); 9-16% de B (5-15 min); 16-36,4% de B (15-33 min) com posterior lavagem e condicionamento da coluna. Para a separação dos compostos fenólicos individuais foi usada uma coluna cromatográfica Symmetry C18 (Waters, EUA; 4,6 x 150 mm; 3,5  $\mu$ m) e a detecção foi realizada em um detector de arranjo de fotodiodos (PDA 2998, Waters, EUA), respectivamente. A identificação e a integração dos picos foram realizadas a 280 nm (floreína 2'- $\beta$ -D-glucosídeo), 320 nm (ácidos 5-cafeoilquínico, cafeico e *p*-cumárico) e 350 nm (quercetina-3-rutinosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetina-3- $\beta$ -D-glucosídeo, quercetina-3-D-xilosídeo, quercetina-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo e quercetina-3-O-raminosídeo). A identificação dos compostos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos comprimentos de onda de absorção máxima dos padrões. O cálculo da concentração foi realizado por meio da equação das curvas de calibração dos padrões (APÊNDICE B).

## 2.2.8 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial das sidras foi realizada segundo Madrera et al. (2010) com modificações, após a aprovação do projeto CAAE 62047516.3.0000.0105 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A análise compreendeu-se de 5 etapas, tais como definição dos atributos, preparo das escalas,

familiarização dos julgadores com as escalas, análise sensorial das amostras e análise de dados.

O painel de julgadores foi composto por 8 pessoas, sendo 2 homens e 6 mulheres, entre 23 e 41 anos, que consomem e/ou trabalham com sidras. Em uma primeira reunião, as amostras foram apresentadas aos julgadores, os quais provaram e definiram os atributos relevantes a serem avaliados: COR, AMARGOR, ACIDEZ, ADSTRINGÊNCIA e QUALIDADE DO ODOR.

Foram preparadas escalas com nove pontos, para cada atributo, exceto qualidade do odor, que foi avaliada por teste afetivo. Os pontos da escala estruturada foram denominados como 1, 3, 5, 7 e 9, correspondendo a muito fraco, fraco, moderado, forte e muito forte, respectivamente. Para cada atributo foi preparada uma escala separadamente, com o cuidado de manter as amostras entre os pontos. A sidra base (elaborada conforme a Sidra I) foi adicionada de diferentes quantidades das seguintes soluções: ácido cítrico 50%, ácido tânico 0,5% e cafeína 0,2% para atributos de acidez, adstringência e amargor, respectivamente. A escala de cor foi realizada por meio da diluição de suco de maçã, apresentado em tubos de ensaio (5 mL).

Foi realizada previamente a familiarização dos julgadores com as escalas. Para tanto, eles receberam, em dois momentos diferentes do dia a escala para degustação, codificada de 1 a 9, sendo direcionados a provar as amostras do menos intenso ao mais intenso, para o conhecimento do atributo. Foram oferecidos água e biscoitos de base neutra para os julgadores limparem o palato entre as amostras. Na sequência, os julgadores receberam as amostras da escala aleatoriamente codificadas, sendo solicitado que eles ordenassem do menor para o maior (APÊNDICE C).

Após o período de familiarização, os julgadores credenciados receberam duas amostras de sidra codificadas, Sidra I (controle) e a Sidra II (fermentada com adição de bagaço imobilizado). Assim, foi solicitado que os julgadores provassem as amostras e marcassem na escala estruturada a posição destas em relação à escala utilizada anteriormente. Para todos os atributos avaliados, cada julgador realizou a análise três vezes em dias diferentes. A ficha de avaliação contendo a escala estruturada utilizada está exemplificada no APÊNDICE D.

Para avaliar a qualidade do odor dos produtos, 5 mL de cada amostra (Sidra I e Sidra II), em temperatura ambiente (20 °C) foram dispostas em tubos de ensaio com tampa, envoltos em papel alumínio, codificados com 3 dígitos aleatórios. Os julgadores foram orientados a abrir o tubo, agitar levemente em forma circular e inspirar profundamente

próximo a boca do tubo. Depois, deveriam atribuir nota, conforme escala hedônica de 9 pontos, variando de 1- desgostei muitíssimo, 2- desgostei muito, 3- desgostei moderadamente, 4- desgostei ligeiramente, 5- indiferente, 6- gostei ligeiramente, 7- desgostei moderadamente, 8- gostei muito, 9- gostei muitíssimo.

### 2.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos por meio de média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de Levene ou Hartley, os quais medem a homogeneidade das variâncias. Os dados que apresentaram  $p \geq 0,05$  no teste anterior foram consideradas como paramétricas, o que permite a aplicação de outros métodos estatísticos como os descritos a seguir. Os resultados foram então analisados por meio do teste de ANOVA, a qual mede a diferença significativa entre as médias e determina se estes dados apresentam alguma influência sobre alguma variável dependente. Na sequência foram realizados os testes de Fisher, que estima diferença entre todas as amostras para o mosto e as sidras, e o teste  $t$  de student que estima diferenças em amostras aos pares, para os extratos dos bagaços. Foi considerado diferença significativa quando as amostras apresentaram  $p < 0,05$ . Para verificar a correlação entre os dados obtidos em diferentes análises, foi aplicado o teste de Correlação de Pearson. Todos os cálculos estatísticos foram realizados por meio do software Statistica v. 13.2 (STATSOFT Inc., Tulsa, OK, EUA). Os dados obtidos na análise sensorial foram analisados por meio da média das respostas dos candidatos. Foi utilizado um gráfico tipo aranha para mostrar as diferenças entre as amostras padrão, e gráfico em barras para expressar os resultados da análise de odor.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 EFEITO DA UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO NA FERMENTAÇÃO DE SIDRAS

Os parâmetros cinéticos determinados podem variar por influência de vários fatores, dentre eles a quantidade inicial de açúcares e nitrogênio (ALBERTI et al., 2011; SANTOS et al., 2015). As sidras fermentadas com adição de bagaço apresentaram uma maior liberação de CO<sub>2</sub> (80,3 g/L) comparada a sidra controle (71,3 g/L). A velocidade máxima de produção de CO<sub>2</sub> foram próximas, sendo 22,3 g/L.dia e 22,9 g/L.dia, para as sidras I e II, respectivamente. Porém, essa velocidade foi atingida em diferentes tempos de fermentação, 0,5 dias para a sidra I e 0,25 dias para sidra II, indicando que a segunda fermentou mais rapidamente.

As quantidades de sacarose, glucose e frutose das sidras, que foram determinadas por CLAE, decresceram durante a fermentação, conforme apresentado na Tabela 2.1. No mosto (dia 0 de fermentação), a frutose foi o açúcar mais abundante, seguido da glucose e da sacarose, totalizando 13,4 g/100mL de açúcares. Estes resultados estão de acordo com Alberti et al. (2016) e Braga et al. (2013), que encontraram quantidades de 9 a 13 mg/L de açúcares em mostos de maçãs Fuji Suprema em diferentes estádios de maturação.

A sacarose (Tabela 2.1) passa primeiramente por um processo de hidrólise, sendo hidrolisada em glucose e frutose, por meio da reação com enzimas exógenas (hidrolases) liberadas pelas leveduras (RETTORI; VOLPE, 1999). Assim, a sacarose foi hidrolisada no primeiro dia, não sendo detectada nas sidras após o primeiro dia de fermentação. Na Sidra II, foi observado no primeiro dia de fermentação (Tabela 2.1) uma extração de açúcares do bagaço, o que resultou no aumento das concentrações de glucose e frutose. A quantidade de glucose diminuiu mais rapidamente que a frutose, sendo consumida totalmente até o 7º dia de fermentação. A frutose apresentou decrescimento até o 11º dia de fermentação para ambas as sidras, permanecendo um residual no produto final. A sidra I apresentou residual de frutose mais baixo comparado a Sidra II ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste t.

Tabela 2.1: Características físico-químicas do mosto e das sidras.

Dias	Amostra	Sacarose (g/100mL)	Glucose (g/100mL)	Frutose (g/100mL)	Etanol (g/100mL)	Sorbitol (g/L)	Nitrogênio (mg/L)	pH	Acidez (g/100mL)
0	Mosto	1,9 ± 0,1	3,1 <sup>b</sup> ± 0,1	8,4 <sup>b</sup> ± 0,1	-	6,8 <sup>de</sup> ± 0,1	175 <sup>a</sup> ± 0,1	3,8	0,25 <sup>f</sup> ± 0,01
1°	Sidra I	-	2,1 <sup>c</sup> ± 0,1	6,0 <sup>d</sup> ± 0,1	1,4 <sup>d</sup> ± 0,4	5,2 <sup>f</sup> ± 0,1	36,9 <sup>bc</sup> ± 7,8	3,8	0,25 <sup>f</sup> ± 0,01
	Sidra II	-	3,9 <sup>a</sup> ± 0,6	9,4 <sup>a</sup> ± 1,1	1,8 <sup>d</sup> ± 0,1	8,5 <sup>ab</sup> ± 1,4	58,1 <sup>bc</sup> ± 3,9	3,7	0,31 <sup>e</sup> ± 0,01
4°	Sidra I	-	0,3 <sup>e</sup> ± 0,1	3,8 <sup>e</sup> ± 0,2	6,1 <sup>c</sup> ± 0,1	6,7 <sup>de</sup> ± 0,1	38,7 <sup>bc</sup> ± 3,5	3,7	0,34 <sup>cd</sup> ± 0,01
	Sidra II	-	0,7 <sup>d</sup> ± 0,2	6,6 <sup>c</sup> ± 0,7	6,6 <sup>bc</sup> ± 0,1	8,1 <sup>a</sup> ± 0,1	52,5 <sup>bc</sup> ± 2,9	3,6	0,45 <sup>a</sup> ± 0,01
7°	Sidra I	-	-	0,6 <sup>f</sup> ± 0,1	6,6 <sup>bc</sup> ± 0,6	6,9 <sup>d</sup> ± 0,6	34,1 <sup>c</sup> ± 2,5	3,7	0,35 <sup>b</sup> ± 0,01
	Sidra II	-	-	0,6 <sup>fg</sup> ± 0,1	8,2 <sup>a</sup> ± 0,1	8,9 <sup>a</sup> ± 0,1	58,9 <sup>bc</sup> ± 4,9	3,7	0,48 <sup>a</sup> ± 0,01
11°	Sidra I	-	-	0,3 <sup>g</sup> ± 0,1	5,9 <sup>bc</sup> ± 0,2	6,4 <sup>e</sup> ± 0,2	34,1 <sup>bc</sup> ± 2,5	3,7	0,32 <sup>de</sup> ± 0,04
	Sidra II	-	-	0,5 <sup>fg</sup> ± 0,1	8,0 <sup>a</sup> ± 0,1	8,7 <sup>a</sup> ± 0,1	63,6 <sup>bc</sup> ± 3,9	3,7	0,47 <sup>a</sup> ± 0,01
15°	Sidra I	-	-	0,3 <sup>g</sup> ± 0,1	7,1 <sup>ab</sup> ± 0,1	7,5 <sup>c</sup> ± 0,1	38,7 <sup>bc</sup> ± 0,1	3,7	0,37 <sup>b</sup> ± 0,01
	Sidra II	-	-	0,6 <sup>fg</sup> ± 0,1	8,5 <sup>a</sup> ± 0,5	9,0 <sup>a</sup> ± 0,4	58,1 <sup>b</sup> ± 3,9	3,6	0,47 <sup>a</sup> ± 0,01

Nota: <sup>abc</sup>: Letras diferentes a mesma coluna indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados segundo o teste de ANOVA. Sidra I: sidra fermentada sem adição de bagaço imobilizado. Sidra II: sidra fermentada com adição de bagaço imobilizado.

A concentração de etanol (Tabela 2.1) foi diferente para as sidras ( $p < 0,05$ ), onde a sidra II apresentou 1,4 g/100mL a mais de etanol que a sidra I. A maior concentração de etanol na sidra II ocorreu, provavelmente, devido à presença e transformações de açúcares do bagaço.

A concentração de sorbitol (Tabela 2.1) no mosto (6,8 g/L) está próximo ao determinado por Alberti et al. (2016) em mostos de maçã Fuji Suprema (7,2 g/L). No primeiro dia de fermentação, a sidra I apresentou menor concentração de sorbitol comparada ao mosto. O decréscimo da concentração de sorbitol no início da fermentação pode estar relacionado a enzima sorbitol desidrogenase, a qual converte o sorbitol em frutose (GOMIS et al., 1988). Após a fermentação foi observado um aumento da quantidade deste poliálcool. De acordo com Fedor, Millar e Accola (1960), esse composto pode ser formado a partir da redução da glucose e da frutose, o que provavelmente resultou no aumento da quantidade deste composto após a fermentação. Na sidra II, a quantidade de sorbitol aumentou logo no primeiro dia de fermentação, o que pode ter ocorrido pela adição do bagaço. Além disso, o bagaço acrescentou açúcares no meio, o que possivelmente influenciou na maior quantidade de sorbitol no produto final.

A quantidade de nitrogênio em sucos pode variar de um lote para outro de acordo com a área de cultivo das maçãs, idade do pomar, a quantidade de fertilizantes nitrogenados utilizados e a estação do ano (ALBERTI et al., 2011). O alto conteúdo inicial no mosto (175 mg/L) foi rapidamente assimilado pelas leveduras na fase de crescimento (Tabela 2.1). Este valor foi maior que 163,64 mg/L, quantidade de nitrogênio total determinada por Alberti et al (2011) em mostos de maçã Fuji.

As bebidas fermentadas como as sidras normalmente apresentam baixa quantidade residual de nitrogênio (MAINENTE et al., 2016; VILLAR et al., 2017). O teor de nitrogênio total do mosto foi consumido no início da fermentação de fermentação, se mantendo constante para ambas as sidras após este período. O nitrogênio residual na sidra I foi de 38,7 mg/L. No entanto, na sidra II essa quantidade foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ), chegando a 58,1 mg/L ao final da fermentação. De acordo com Nogueira et al. (2008), a quantidade de nitrogênio residual após a fermentação do mosto de maçã varia entre 20 e 35 mg/L, sendo que valores acima podem indicar que há nitrogênio assimilável residual na sidra. Esse residual, porém, pode ser indesejado, uma vez que pode causar instabilidade microbiológica (ALBERTI et al., 2011). Além disso, o residual de nitrogênio na sidra pode proporcionar a formação do *haze*, precipitado formado pela interação de compostos fenólicos

e compostos nitrogenados, por meio de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (MANGAS et al., 1999; ALONSO-SALCES et al., 2001)

Parâmetros como pH e acidez influenciam na conservação e na percepção sensorial, principalmente em atributos como a cor e o sabor (MALEC et al., 2014; SYMONEAUX et al., 2014). O mosto apresentou pH 3,8 e acidez 0,25 g/100mL (expresso em ácido málico, o principal em maçãs e seus produtos). A sidra II apresentou maior acidez ( $p < 0,05$ ), apresentando também pH mais baixo do que a sidra I. Estes resultados estão próximos aos determinados por Ye, Yue e Yuan (2014) para pH (3,78) e acidez titulável (0,28 g/100mL) para mostos de maçã Fuji.

A cor, considerada como importante parâmetro de qualidade em sucos e sidras pode influenciar na aceitabilidade e na intenção de compra desses produtos (CLYDESDALE, 1993; MALEC et al., 2014). Usando os valores dos parâmetros  $a^*$  (variação de verde a vermelho) e  $b^*$  (variação de azul a amarelo), foram determinados os parâmetros como o ângulo *hue* ( $h^\circ$ ) e a cromaticidade ( $C^*$ ). O  $h^\circ$  indica a tonalidade de uma amostra em um plano cartesiano, o qual apresenta as cores vermelho, amarelo, verde e azul dispostas nos ângulos de  $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  e  $270^\circ$ , respectivamente, ao passo que  $C^*$  indica a saturação da cor, a qual varia de 0 em amostras acinzentadas a valores maiores que 60 em amostras de cor intensa (MALEC et al., 2014). Também foi mensurada a diferença total da cor ( $\Delta E$ ), que utiliza os parâmetros L,  $a^*$  e  $b^*$  para indicar o quanto uma amostra é diferente de um padrão.

Sucos e mostos de maçã tendem a apresentar coloração mais escura, onde o parâmetro  $L^*$  é menor e os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  são maiores, devido ao escurecimento enzimático (LE DEUN et al., 2015; HEINMAA et al., 2017). O mosto apresentou luminosidade menor do que as sidras (Tabela 2.2), o que segundo Le Deun et al. (2015), pode estar atrelada à quantidade de compostos fenólicos oxidados, que formam pigmentos marrons, denominados melaninas. Nas sidras, de acordo com Nogueira et al. (2008), observa-se a clarificação do produto durante a fermentação, a qual pode estar relacionada a retenção compostos fenólicos na parede celular de leveduras. Desse modo, a luminosidade ( $L^*$ ) tende a aumentar nas sidras (Tabela 2.2). Os valores de  $a^*$  e  $b^*$  tendem a diminuir, devido à coloração amarela das mesmas. Na sidra I, a luminosidade aumentou de 65,06 (mosto) para 91,21. A sidra II apresentou uma luminosidade maior que a sidra controle (93,43). A diferença total das cores ( $\Delta E$ ), que indica o quanto a cor de uma amostra é diferente da cor de uma amostra referencial, foi calculada tendo o mosto como padrão. Essa equação foi desenvolvida devido a necessidade de obter respostas mais próximas às percebidas pelo olho humano (GHINEA et al., 2010). A sidra fermentada com adição de bagaço apresentou uma maior diferença total

(66,39) após o 15º dia de fermentação, valor 15,4% maior que a sidra controle. O  $h^\circ$  indicou que as sidras apresentam cor amarela ( $h^\circ = 90,82^\circ$  e  $h^\circ = 93,40^\circ$  para as sidras I e II, respectivamente) e o mosto ( $h^\circ = 75,44^\circ$ ) cor em uma região intermediária entre laranja ( $h^\circ = 45^\circ$ ) e amarelo ( $h^\circ = 90^\circ$ ). Foi observada uma redução da intensidade da cor das sidras durante a fermentação, uma vez que o valor de  $C^*$  diminuiu durante os 15 dias. Dessa forma, pode-se dizer que a cor do mosto foi mais intensa.

Por fim, a cor do mosto pode ser descrita como amarelo alaranjada, intensa, e de luminosidade média, característica que indica oxidação de compostos fenólicos (LE DEUN et al., 2015), ao passo que as sidras podem ser descritas como amarelas, de cor menos intensa que o mosto e de alta luminosidade, devido a retenção de parte dos compostos fenólicos na parede celular das leveduras (NOGUEIRA et al., 2008). A cor da sidra II apresentou maior luminosidade e menor intensidade que a sidra I, provavelmente devido à interação do mosto com o bagaço.

Tabela 2.2: Parâmetros de cor do mosto e das sidras.

Dias	Amostra	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$	$C^*$	$h^\circ$
0	Mosto	65,06 <sup>h</sup> ± 0,04	20,27 <sup>a</sup> ± 0,08	78,04 <sup>a</sup> ± 0,12	-	80,63 <sup>a</sup> ± 0,12	75,44 <sup>i</sup> ± 0,05
1°	Sidra I	87,01 <sup>g</sup> ± 0,08	-1,93 <sup>b</sup> ± 0,02	51,89 <sup>b</sup> ± 0,17	40,73 <sup>i</sup> ± 0,16	51,93 <sup>b</sup> ± 0,17	92,13 <sup>h</sup> ± 0,03
	Sidra II	88,14 <sup>f</sup> ± 0,13	-2,82 <sup>gh</sup> ± 0,03	50,96 <sup>b</sup> ± 0,14	42,42 <sup>h</sup> ± 0,16	51,04 <sup>b</sup> ± 0,14	93,17 <sup>g</sup> ± 0,04
4°	Sidra I	90,43 <sup>e</sup> ± 0,16	-2,60 <sup>ef</sup> ± 0,02	32,97 <sup>c</sup> ± 0,19	56,55 <sup>g</sup> ± 0,17	33,07 <sup>c</sup> ± 0,19	94,50 <sup>ef</sup> ± 0,06
	Sidra II	92,25 <sup>c</sup> ± 0,13	-2,95 <sup>h</sup> ± 0,06	26,37 <sup>f</sup> ± 0,22	62,84 <sup>d</sup> ± 0,14	26,53 <sup>f</sup> ± 0,22	96,38 <sup>c</sup> ± 0,07
7°	Sidra I	90,41 <sup>e</sup> ± 0,01	-2,35 <sup>c</sup> ± 0,02	31,43 <sup>d</sup> ± 0,48	57,68 <sup>f</sup> ± 0,39	31,52 <sup>d</sup> ± 0,47	94,27 <sup>f</sup> ± 0,09
	Sidra II	92,97 <sup>b</sup> ± 0,11	-2,64 <sup>efg</sup> ± 0,13	22,84 <sup>g</sup> ± 0,29	65,97 <sup>c</sup> ± 0,23	22,99 <sup>g</sup> ± 0,31	96,59 <sup>c</sup> ± 0,25
11°	Sidra I	90,65 <sup>de</sup> ± 0,05	-2,41 <sup>cd</sup> ± 0,04	29,2 <sup>e</sup> ± 0,46	59,61 <sup>e</sup> ± 0,34	29,31 <sup>e</sup> ± 0,46	94,71 <sup>de</sup> ± 0,03
	Sidra II	93,24 <sup>a</sup> ± 0,16	-2,76 <sup>g</sup> ± 0,014	21,74 <sup>h</sup> ± 0,34	67,04 <sup>a</sup> ± 0,18	21,91 <sup>h</sup> ± 0,35	97,23 <sup>b</sup> ± 0,25
15°	Sidra I	90,82 <sup>d</sup> ± 0,45	-2,55 <sup>de</sup> ± 0,13	29,48 <sup>e</sup> ± 0,45	59,52 <sup>e</sup> ± 0,40	29,59 <sup>e</sup> ± 0,44	94,9 <sup>d</sup> ± 0,42
	Sidra II	93,40 <sup>a</sup> ± 0,07	-3,31 <sup>i</sup> ± 0,27	22,83 <sup>g</sup> ± 0,85	66,39 <sup>bc</sup> ± 0,63	23,07 <sup>g</sup> ± 0,88	98,25 <sup>a</sup> ± 0,36

Nota: <sup>abc</sup>: Letras diferentes a mesma coluna indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados segundo o teste de ANOVA. Sidra I: sidra fermentada sem adição de bagaço imobilizado. Sidra II: sidra fermentada com adição de bagaço imobilizado.  $L$ : Luminosidade.  $\Delta E$ : Diferença total da cor.  $C^*$ : Cromaticidade.  $h^\circ$ : Ângulo hue.

### 2.3.2 EFEITO NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DAS SIDRAS

A composição fenólica em sucos e mostos de maçã pode variar em função da cultivar da maçã, do estágio de maturação (ALBERTI et al., 2016), da origem geográfica (ALVAREZ et al., 2017), da oxidação dos compostos, da utilização de enzimas pectinolíticas antes da prensagem das maçãs raladas (ZIELINSKI et al., 2014) e da clarificação do suco/mosto bruto (ZARDO et al., 2008). O mosto de maçã Fuji apresentou em torno de 485 mg/L de compostos fenólicos totais. Este valor está acima de 255 mg/L, quantidade determinada por Zardo et al. (2008) de compostos fenólicos totais para mostos da cultivar Fuji.

Durante o processo fermentativo de bebidas alcoólicas como as sidras, muitas reações bioquímicas ocorrem, como o consumo de açúcares gerando etanol, gás carbônico e outros produtos, tais como os ácidos orgânicos (YE; YUE; YUAN, 2014; VILLAR et al., 2017), os compostos voláteis (PIETROWSKI et al., 2012; SANTOS et al., 2015) e, ainda, provocando mudanças na composição dos compostos fenólicos (YE; YUE; YUAN, 2014). Foi observado, que a composição fenólica total da sidra I diminuiu cerca de 40% após a fermentação. Em um estudo realizado com maçãs cultivadas na China, Ye; Yue e Yuan (2014) observaram flutuações no teor de fenóis individuais durante a fermentação da sidra (cv. Fuji), sendo que ao final do processo, a maioria dos compostos apresentaram menor quantidade comparado ao mosto, exceto o ácido protocatecuico que se formou quando catequinas foram metabolizadas. Esse fenômeno pode estar relacionado, segundo os mesmos autores, à polimerização de procianidinas; à sensibilidade de alguns compostos ao escurecimento enzimático e, ainda, a bioconversão de compostos, realizado pelas leveduras. De acordo com Morata et al. (2003) as leveduras *S. cerevisiae* podem adsorver compostos fenólicos durante a fermentação alcoólica, contribuindo também para a redução da quantidade de compostos fenólicos. Esse fenômeno ocorre devido aos polímeros polares, formados por manoproteínas ligadas à glucanas e quitinas, que compõem a parede celular das leveduras e possuem capacidade de atrair outros compostos. Sobretudo, a membrana celular das leveduras apresenta porosidade, o que também facilita a retenção de compostos (BOIVIN et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2008). Zardo et al. (2008) observaram que a composição fenólica de sidras elaboradas com maçãs das cultivares Gala, Fuji e Joaquina diminuiu nas primeiras 9 h de fermentação, permanecendo constante a partir deste ponto até o final da fermentação (360 h). Da mesma forma que ocorreu com os compostos fenólicos totais, foi observado que a

quantidade de flavonoides totais e flavanóis 46% e 79%, respectivamente, após a fermentação.

Objetivando o reaproveitamento e a valorização do bagaço da maçã, sidras foram produzidas com a adição de bagaço imobilizado durante a fermentação (sidra II). Foi observada a extração dos compostos fenólicos do bagaço logo no primeiro dia de fermentação, atingindo 14,19% a mais que o encontrado no mosto. Assim como no processo de maceração que ocorre na produção do vinho, a extração dos compostos do bagaço para o mosto de maçã ocorre por dois mecanismos principais, primeiramente por dissolução e depois por difusão (RIZZON; MIELE; MENEGUZZO, 1999).

Assim como observado para a sidra I, a sidra II também apresentou decréscimo da quantidade de compostos fenólicos durante a fermentação. Entretanto, no final da fermentação a sidra II apresentou 31,81% mais compostos fenólicos totais comparada à sidra I. Para flavonoides totais e flavanóis, foram mensurados valores 18% e 56% maiores, respectivamente, no final da fermentação da sidra II. Assim como observado nas sidras, Lukic; Lotti e Vrhovsek (2017) verificaram uma maior concentração de compostos fenólicos em vinhos brancos fermentados com cascas de uva, comparados aos vinhos que não receberam esse tipo de tratamento. Os autores ainda mencionam que o efeito da adição das cascas de uva foi claramente evidenciado nos vinhos logo no primeiro dia de fermentação. Assim, a extração dos compostos fenólicos do bagaço faz com que ocorra um aumento dos fenóis na sidra suplementada (sidra II) em relação a sidra I.

A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada por meio de quatro métodos diferentes, tais como a captura do radical (ABTS e DPPH) e a redução de íons (FRAP e CUPRAC). A atividade antioxidante do mosto foi de 705  $\mu\text{mol TE/L}$ , 851  $\mu\text{mol TE/L}$ , 4398  $\mu\text{mol TE/L}$  e 693  $\mu\text{mol TE/L}$  para os métodos de DPPH, FRAP, CUPRAC e ABTS, respectivamente (Tabela 2.3). Os compostos fenólicos estão entre os principais compostos bioativos responsáveis pela atividade antioxidante em maçãs (TSAO et al., 2005; CRAFT et al., 2012). Desse modo, a redução da quantidade de compostos fenólicos após a fermentação acarretou na redução da atividade antioxidante, cuja redução foi de 3,7% (FRAP) a 32,1% (CUPRAC) após a fermentação da sidra I.

O processo de maceração em vinhos aumenta a atividade antioxidante das bebidas (OLEJAR; FEDRIZZI; KLIMARTIN, 2015a). Da mesma forma, a extração dos compostos fenólicos durante a fermentação da sidra II influenciou positivamente na atividade antioxidante (Tabela 2.3). A qual foi aproximadamente 30% maior na sidra II, estimada pelo método de ABTS, 47% pelo método de CUPRAC e 45% pelo método de FRAP. Dessa forma,

a sidra foi melhorada em relação ao potencial antioxidante, o que favoreceu a suplementação do produto e atribuiu a este uma característica funcional. Os métodos usados para determinação de atividade antioxidante apresentaram correlação com os compostos fenólicos totais, flavonoides totais e sua subclasse, flavanóis ( $p < 0,01$ ). A atividade antioxidante determinada pelos métodos de ABTS, CUPRAC e FRAP apresentaram correlação com os fenóis totais ( $r_{ABTS \times CFT} = 0,67$ ;  $r_{CUPRAC \times CFT} = 0,61$  e  $r_{FRAP \times CFT} = 0,36$ ), os flavonoides totais ( $r_{ABTS \times FT} = 0,74$ ,  $r_{CUPRAC \times FT} = 0,76$  e  $r_{FRAP \times FT} = 0,49$ ) e os flavanóis ( $r_{ABTS \times FLA} = 0,79$ ,  $r_{CUPRAC \times FLA} = 0,80$  e  $r_{FRAP \times FLA} = 0,49$ ), ao passo que a atividade antioxidante pelo método de DPPH apresentou correlação apenas com os flavonoides totais ( $r_{DPPH \times FT} = 0,47$ ) e os flavanóis ( $r_{DPPH \times FLA} = 0,36$ ). A atividade antioxidante pode ser influenciada pela estrutura do composto fenólico. Desta forma, os flavonoides podem apresentar transferência de hidrogênio, resultando em uma maior atividade antioxidante conforme a disposição das hidroxilas no anel B (PANNALA et al., 2001), o que justifica a maior correlação com os métodos de atividade antioxidante utilizados. Além disso, os métodos de atividade antioxidante utilizados podem atuar de maneira diferente, tais como transferência simples de elétrons (TSE), transferência de hidrogênio (TAH), ou pelos dois mecanismos combinados (CRAFT et al., 2012). Nos métodos de ABTS e DPPH a variação da cor ocorre devido à transferência de um elétron e à transferência de um átomo de hidrogênio, que acontecem simultaneamente. Os radicais ABTS e DPPH são reduzidos, sendo isto mensurado por meio da perda de cor da solução (CRAFT et al., 2012). Nos ensaios de FRAP e de CUPRAC a redução dos íons  $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$  (transferência de elétrons), respectivamente, são responsáveis pela mudança de coloração do meio (APAK et al., 2016).

Tabela 2.3: Composição e atividade antioxidante *in vitro* do mosto e das sidras durante a fermentação alcoólica.

Dias	Amostra	Compostos fenólicos			Atividade antioxidante <i>in vitro</i>			
		CFT*	Flavonoides**	Flavanóis**	ABTS***	CUPRAC***	DPPH***	FRAP***
0	Mosto	485 <sup>b</sup> ± 22	150,8 <sup>a</sup> ± 5,8	134,3 <sup>a</sup> ± 5,4	693 <sup>a</sup> ± 31	4399 <sup>ab</sup> ± 108	706 <sup>a</sup> ± 69	852 <sup>d</sup> ± 13
1°	Sidra I	427 <sup>cd</sup> ± 8	71,7 <sup>fg</sup> ± 4,6	33,5 <sup>f</sup> ± 2,2	500 <sup>bc</sup> ± 41	2854 <sup>e</sup> ± 71	645 <sup>bcde</sup> ± 9	742 <sup>e</sup> ± 18
	Sidra II	554 <sup>a</sup> ± 24	104,6 <sup>cd</sup> ± 4,1	72,6 <sup>cd</sup> ± 4,3	663 <sup>a</sup> ± 17	3938 <sup>c</sup> ± 133	613 <sup>ef</sup> ± 27	845 <sup>d</sup> ± 7
4°	Sidra I	358 <sup>f</sup> ± 25	76,6 <sup>f</sup> ± 6,5	31,6 <sup>fg</sup> ± 1,7	479 <sup>bc</sup> ± 51	3142 <sup>d</sup> ± 339	659 <sup>bc</sup> ± 23	826 <sup>de</sup> ± 79
	Sidra II	490 <sup>b</sup> ± 32	106,8 <sup>c</sup> ± 3,7	75,5 <sup>c</sup> ± 3,4	686 <sup>a</sup> ± 53	4135 <sup>ab</sup> ± 404	672 ± 15 <sup>b</sup>	1202 <sup>c</sup> ± 81
7°	Sidra I	334 <sup>f</sup> ± 13	84,9 <sup>e</sup> ± 3,8	31,7 <sup>fg</sup> ± 2,4	483 <sup>bc</sup> ± 12	3067 <sup>e</sup> ± 53	659 ± 8 <sup>bc</sup>	883 <sup>d</sup> ± 54
	Sidra II	447 <sup>c</sup> ± 14	111,9 <sup>b</sup> ± 4,5	76,5 <sup>bc</sup> ± 2,6	710 <sup>a</sup> ± 12	4488 <sup>a</sup> ± 132	672 ± 18 <sup>b</sup>	1259 <sup>a</sup> ± 48
11°	Sidra I	281 <sup>g</sup> ± 24	71,3 <sup>f</sup> ± 3,5	27,8 <sup>h</sup> ± 0,9	557 <sup>b</sup> ± 7	4108 <sup>d</sup> ± 117	603 ± 24 <sup>f</sup>	843 <sup>d</sup> ± 12
	Sidra II	416 <sup>d</sup> ± 13	106,9 <sup>c</sup> ± 4,2	70,5 <sup>d</sup> ± 2,5	696 <sup>a</sup> ± 12	4440 <sup>ab</sup> ± 163	654 ± 14 <sup>bcd</sup>	1364 <sup>b</sup> ± 83
15°	Sidra I	292 <sup>g</sup> ± 13	82,1 <sup>e</sup> ± 2,6	28,6 <sup>gh</sup> ± 1,6	471 <sup>c</sup> ± 10	2988 <sup>e</sup> ± 169	668 ± 18 <sup>b</sup>	820 <sup>de</sup> ± 35
	Sidra II	385 <sup>e</sup> ± 35	100,1 <sup>d</sup> ± 1,6	65,1 <sup>e</sup> ± 5,2	680 <sup>a</sup> ± 9	4389 <sup>ab</sup> ± 165	637 ± 26 <sup>cde</sup>	1270 <sup>b</sup> ± 52

Nota: <sup>abc</sup>: Letras diferentes representam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras pelo teste de ANOVA. Sidra I: sidra controle. Sidra II: sidra fermentada com bagaço imobilizado. CFT: Composição fenólica total. TE: Trolox equivalente. \*: Expresso em miligrama de ácido 5-cafeoilquínico equivalente por litro de mosto ou sidra (mg ACQ/L). \*\*: Expresso em miligrama de catequina equivalente por litro de mosto ou sidra (mg CAT/L). \*\*\*: Expresso em micromol de trolox equivalente por litro de mosto ou sidra ( $\mu\text{mol TE/L}$ ).

### 2.3.3 EFEITO DA UTILIZAÇÃO DO BAGAÇO IMOBILIZADO NA EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS

As sidras apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em termos dos compostos fenólicos individuais (Tabela 2.4). As principais classes de compostos fenólicos estão dispostas em diferentes partes da fruta, como endocarpo, mesocarpo e epicarpo (ALBERTI et al., 2017), das quais algumas são, em sua maior parte, transferidas para o mosto (principalmente ácido 5-cafeoilquínico, floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo, (-)-epicatequina e (+)-catequina) durante o processamento, e outras retidas no bagaço de maçã (principalmente os glucosídeos de quercetina) (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Dessa forma, alguns compostos que ficaram retidos no bagaço foram recuperados na fermentação da sidra II.

A quantidade de compostos fenólicos determinada por Folin-Ciocalteu diminuiu no decorrer da fermentação (Tabela 2.3). Entretanto, nem todos os compostos seguiram esta tendência, sendo que alguns aumentaram em relação ao ponto inicial (mosto), provavelmente devido aos processos de bioconversão, realizado pelas leveduras (MADRERA et al., 2006; YE; YUE; YUAN, 2014).

A floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo (Tabela 2.4), também conhecida por floridzina, é uma dihidrochalcona considerada um biomarcador em maçãs e seus produtos, visto que se encontra em quantidade muito pequena em outras plantas, como morangos por exemplo (ZIAULLAH et al., 2013; ALBERTI et al., 2017). Dessa forma, produtos que contêm quantidades significativas deste composto provavelmente contêm maçãs na sua formulação. A floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo foi encontrada no mosto e na sidra I, nas quantidades de 2,72 e 4,81 mg/L, respectivamente. Na sidra II a quantidade final de floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo foi cerca de 3 vezes superior a sidra I (15,55 mg/L).

O ácido 5-cafeoilquínico foi o principal ácido fenólico determinado nas bebidas (Tabela 2.4). No mosto foram quantificados 18,96 mg/L deste composto. Na sidra II, este foi extraído do bagaço até o 7º dia de fermentação, chegando a 29,37 mg/L. Porém, a partir deste ponto apresentou comportamento decrescente em ambas as sidras. Esta redução pode estar atrelada à clivagem deste composto, que forma ácido cafeico e ácido quínico (MADRERA; LOBO; VALES, 2006; YE; YUE; YUAN, 2014). Deste modo, o ácido cafeico, um ácido cinâmico livre, não foi detectado no mosto, porém formado durante a fermentação das sidras, chegando a 2,69 mg/L na sidra I e 3,86 mg/L na sidra II.

Tabela 2.4: Composição fenólica individual das sidras.

Dias	Amostra	Compostos fenólicos (mg/L)									
		FLZ	ACQ	ACF	AC	QRU	QGAL	QGLU	QXI	QAF	QRA
	Mosto	2,72 <sup>i</sup> ± 0,01	18,96 <sup>j</sup> ± 0,02	nd	Nd	2,68 <sup>g</sup> ± 0,01	0,73 <sup>i</sup> ± 0,01	1,41 <sup>i</sup> ± 0,01	nd	nd	0,92 <sup>i</sup> ± 0,01
1	Sidra I	4,81 <sup>h</sup> ± 0,01	24,31 <sup>i</sup> ± 0,01	0,51 <sup>i</sup> ± 0,01	1,41 <sup>g</sup> ± 0,01	2,83 <sup>e</sup> ± 0,01	1,06 <sup>f</sup> ± 0,01	1,63 <sup>e</sup> ± 0,01	nd	nd	1,19 <sup>f</sup> ± 0,01
	Sidra II	8,34 <sup>e</sup> ± 0,02	26,17 <sup>j</sup> ± 0,01	nd	1,25 <sup>h</sup> ± 0,04	3,89 <sup>d</sup> ± 0,01	4,66 <sup>e</sup> ± 0,01	2,13 <sup>d</sup> ± 0,01	nd	0,90 <sup>c</sup> ± 0,01	1,45 <sup>e</sup> ± 0,01
4	Sidra I	5,50 <sup>g</sup> ± 0,01	24,11 <sup>h</sup> ± 0,11	0,70 <sup>h</sup> ± 0,05	1,68 <sup>d</sup> ± 0,01	2,73 <sup>ef</sup> ± 0,02	0,79 <sup>g</sup> ± 0,08	1,58 <sup>g</sup> ± 0,03	nd	nd	1,16 <sup>g</sup> ± 0,03
	Sidra II	14,50 <sup>b</sup> ± 0,08	27,48 <sup>f</sup> ± 0,22	1,52 <sup>f</sup> ± 0,01	2,03 <sup>a</sup> ± 0,07	4,65 <sup>a</sup> ± 0,03	7,46 <sup>c</sup> ± 0,04	3,09 <sup>b</sup> ± 0,01	1,62 <sup>d</sup> ± 0,02	1,34 <sup>a</sup> ± 0,01	2,57 <sup>d</sup> ± 0,01
7	Sidra I	5,76 <sup>f</sup> ± 0,11	24,01 <sup>g</sup> ± 0,51	1,42 <sup>g</sup> ± 0,05	1,74 <sup>c</sup> ± 0,03	2,70 <sup>g</sup> ± 0,01	0,80 <sup>g</sup> ± 0,01	1,61 <sup>f</sup> ± 0,01	nd	nd	1,18 <sup>fg</sup> ± 0,03
	Sidra II	11,51 <sup>d</sup> ± 0,03	29,37 <sup>e</sup> ± 0,19	1,83 <sup>e</sup> ± 0,34	1,83 <sup>b</sup> ± 0,10	4,49 <sup>b</sup> ± 0,24	9,75 <sup>a</sup> ± 0,01	3,45 <sup>a</sup> ± 0,02	2,54 <sup>a</sup> ± 0,01	0,85 <sup>e</sup> ± 0,01	3,37 <sup>a</sup> ± 0,01
11	Sidra I	5,87 <sup>f</sup> ± 0,04	22,60 <sup>d</sup> ± 0,50	2,23 <sup>d</sup> ± 0,01	1,31 <sup>h</sup> ± 0,06	2,70 <sup>g</sup> ± 0,04	0,77 <sup>g</sup> ± 0,01	1,56 <sup>h</sup> ± 0,02	nd	nd	1,13 <sup>h</sup> ± 0,01
	Sidra II	13,01 <sup>c</sup> ± 0,43	26,85 <sup>c</sup> ± 0,04	2,50 <sup>c</sup> ± 0,10	1,45 <sup>fg</sup> ± 0,07	4,13 <sup>c</sup> ± 0,04	7,09 <sup>d</sup> ± 0,01	2,86 <sup>c</sup> ± 0,01	2,04 <sup>c</sup> ± 0,01	0,88 <sup>d</sup> ± 0,01	2,87 <sup>c</sup> ± 0,01
15	Sidra I	5,91 <sup>f</sup> ± 0,05	20,62 <sup>b</sup> ± 0,32	2,70 <sup>b</sup> ± 0,08	1,16 <sup>i</sup> ± 0,04	2,69 <sup>g</sup> ± 0,04	0,73 <sup>h</sup> ± 0,01	1,59 <sup>g</sup> ± 0,02	nd	nd	1,18 <sup>fg</sup> ± 0,06
	Sidra II	15,55 <sup>a</sup> ± 0,09	23,59 <sup>a</sup> ± 0,29	3,87 <sup>a</sup> ± 0,03	1,50 <sup>e</sup> ± 0,04	7,92 <sup>c</sup> ± 0,07	7,92 <sup>b</sup> ± 0,07	3,10 <sup>b</sup> ± 0,01	2,36 <sup>b</sup> ± 0,03	0,99 <sup>b</sup> ± 0,01	3,27 <sup>b</sup> ± 0,01

Nota: <sup>abc</sup>: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras segundo teste de ANOVA. Sidra I: sidra controle. Sidra II: Sidra fermentada com bagaço imobilizado. nd: não determinado. FLZ: Floretina-2'-β-D-glucosídeo. ACQ: Ácido-5-cafeoilquínico. ACF: Ácido cafeico. AC: Ácido *p*-cumárico. QRU: Quercetina-3-rutinosídeo. QGAL: Quercetina-3-D-galactosídeo. QGLU: Quercetina-3-β-D-glucosídeo. QXI: Quercetina-D-xilosídeo. QAF: Quercetina-O-α-L-arabinofuranosídeo. QRA: Quercetina-3-O-raminosídeo.

Assim como o ácido caféico, o ácido *p*-cumárico, não identificado no mosto, foi formado durante o processo fermentativo até o 4º dia. A formação deste composto pode estar relacionada à hidrólise do ácido *p*-cumaroilquínico (MADRERA; LOBO; VALLES, 2006), o qual não foi estudado neste experimento, porém está presente a maioria das sidras estudadas (MADRERA; LOBO; VALLES, 2006; ZURRARIAN et al., 2014; LAAKSONEN et al., 2017). A partir do sétimo dia, a quantidade de ácido *p*-cumárico passou a decrescer. Salameh et al. (2008), analisaram a evolução deste composto na fermentação de vinhos e observaram que, em meio ácido e na presença de etanol, o ácido *p*-cumárico pode ser esterificado, formando flavonoides.

Alguns compostos como os flavonóis, especialmente os glucosídeos de quercetina, estão concentrados na casca das maçãs (ALBERTI et al., 2017), principal fração que compõe o bagaço. Os flavonóis foram, em geral, constantes na sidra I, contudo, a sidra II apresentou uma quantidade significativamente superior ( $p < 0,05$ ), devido ao contato do mosto com as frações da casca presentes no bagaço. A quercetina-3-rutinosídeo foi encontrada na concentração de 3 mg/L na sidra I, enquanto que na sidra II esse valor foi de 4 mg/L (Tabela 2.4). A quercetina 3-D-galactosídeo foi principal flavonol extraído (Tabela 2.4). Na sidra I, a quantidade de quercetina 3-D-galactosídeo se manteve constante (em torno de 1 mg/L), porém na sidra II, a concentração deste composto chegou a aproximadamente 10 mg/L no 7º dia de fermentação, decrescendo novamente após este período, chegando a 8 mg/L. A quercetina-3- $\beta$ -D-glucosídeo apresentou o mesmo comportamento que a quercetina-3-rutinosídeo, porém sua concentração foi mais baixa (cerca de 2 mg/L na sidra I e 3 mg/L na sidra II). A quercetina-3-D-xilosídeo foi extraída exclusivamente do bagaço, uma vez que não foi identificada nos pontos da fermentação da sidra I, chegando a aproximadamente 2 mg/L na sidra II. A quercetina-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo apresentou variação nas sidras, sendo que no final da fermentação este composto não foi identificado na sidra I, ao passo que a sidra II apresentou apenas 2 mg/L. A quercetina-3-O-ramnosídeo também apresentou o mesmo comportamento da quercetina-3-rutinosídeo. De acordo com Monagas, Bartolomé e Gomez-Cordovéz (2007) e Bimpilas et al. (2015), o perfil de flavonóis em vinhos, especialmente glucosídeos de quercetina, pode ser modificado devido à hidrólise de quercetinas glicosiladas, a qual ocorre devido à presença de enzimas como a  $\beta$ -glucosidase liberadas pelas leveduras.

### 2.3.4 EFEITO DA FERMENTAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE MAÇÃ

A composição do bagaço varia de acordo com características da matéria prima, como cultivar, estágio de maturação, condições ambientais de produção, e do processamento, tais como eventual processo de branqueamento, grau de separação da casca e da polpa, presença ou não de pedúnculos e sementes, e ainda, condições do processo de secagem (MADRERA; VALLES, 2011; LAVELLI; CORTI, 2011; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). O conteúdo de nitrogênio dos bagaços de maçã Fuji foi de 0,3 g/100g de bagaço seco (Figura 2.4). Durante a fermentação foram observadas algumas alterações na composição do bagaço. Foi observado o aumento ( $p < 0,05$ ) da quantidade de nitrogênio (Figura 2.6) em até 5 vezes a quantidade inicial, efeito que pode estar relacionado à retenção de leveduras e/ou atrelado a redução da quantidade de outros compostos, como os açúcares, o que concentra os demais constituintes da amostra.

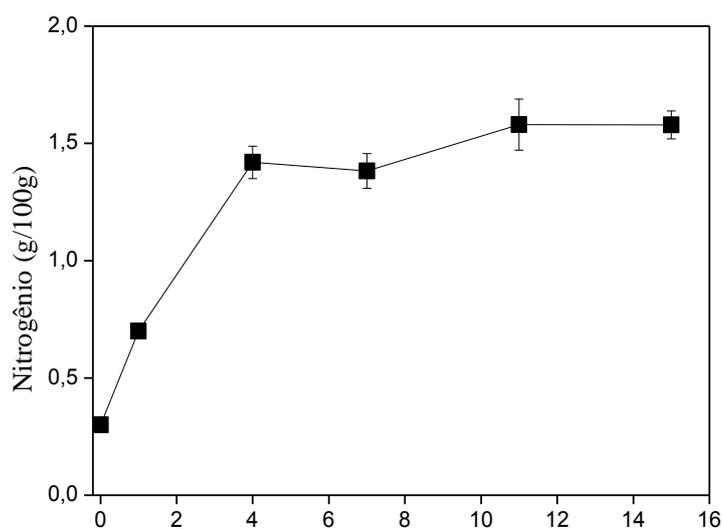


Figura 2.4: Nitrogênio nos bagaços de maçã fermentados.

A quantidade de fenóis totais do bagaço foi de 7188 mg/kg de bagaço seco. Essa quantidade foi superior ao determinado por Ito et al. (2016) para o bagaço da mesma cultivar (5626 mg/kg). Os flavonoides foram mensurados em 2676, mg/kg de bagaço desidratado. As subclasse, flavanóis, foi determinada em 2741 mg/kg de bagaço desidratado. Apesar da subclasse flavanóis apresentar valor maior do que a classe dos flavonoides, os resultados não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

O bagaço de maçã apresentou redução da quantidade de fenóis totais, flavonóides e flavanóis ( $p < 0,05$ ) no decorrer da fermentação, devido à extração dos compostos fenólicos

para a sidra. Essa extração dos fenóis do bagaço implicou na redução da atividade antioxidante *in vitro* do subproduto (Tabela 2.5).

A atividade antioxidante dos bagaços foi determinada por quatro métodos diferentes, como a captura dos radicais livres DPPH e ABTS, e potencial de redução de íons como Ferro (FRAP) e Cobre (CUPRAC). A atividade antioxidante do bagaço *in natura* foi de 59994  $\mu\text{mol TE/kg}$  de bagaço seco para o método de ABTS, 15187  $\mu\text{mol TE/kg}$  para DPPH (redução = 20,10%), 28521  $\mu\text{mol TE/kg}$  para FRAP e 60087  $\mu\text{mol TE/kg}$  para CUPRAC. Estes resultados foram menores que a atividade antioxidante determinada por Ito et al. (2016) pelos métodos de FRAP (36190  $\mu\text{mol TE/kg}$ ) e DPPH (redução = 30,99%) para bagaços de maçãs da mesma cultivar. Os métodos ABTS e FRAP apresentaram correlação significativa entre eles com DPPH e CUPRAC ( $r > 0,62$ ,  $p < 0,05$ ). Os métodos de DPPH e CUPRAC não apresentaram correlação significativa entre si ( $p \geq 0,05$ ).

Tabela 2.5: Caracterização do bagaço de maçã no decorrer da fermentação.

Dias	Composição fenólica (mg/kg)			Atividade Antioxidante ( $\mu\text{mol TE/kg}$ )			
	CFT *	Flavonoides**	Flavanóis**	ABTS***	CUPRAC***	DPPH***	FRAP***
0	7188 <sup>a</sup> $\pm$ 492	2676 <sup>a</sup> $\pm$ 85	2741 <sup>a</sup> $\pm$ 371	59994 <sup>a</sup> $\pm$ 1557	60087 <sup>a</sup> $\pm$ 1764	15187 <sup>a</sup> $\pm$ 1164	28521 <sup>a</sup> $\pm$ 1714
1	4420 <sup>bc</sup> $\pm$ 283	1297 <sup>e</sup> $\pm$ 44	865 <sup>e</sup> $\pm$ 22	34545 <sup>b</sup> $\pm$ 641	46420 <sup>c</sup> $\pm$ 1886	13103 <sup>b</sup> $\pm$ 927	15083 <sup>c</sup> $\pm$ 1501
4	4514 <sup>bc</sup> $\pm$ 167	1668 <sup>c</sup> $\pm$ 67	1053 <sup>cd</sup> $\pm$ 43	34778 <sup>b</sup> $\pm$ 2416	52337 <sup>b</sup> $\pm$ 3360	8033 <sup>d</sup> $\pm$ 762	15917 <sup>b</sup> $\pm$ 1404
7	4742 <sup>b</sup> $\pm$ 341	1798 <sup>b</sup> $\pm$ 122	1241 <sup>b</sup> $\pm$ 98	36433 <sup>b</sup> $\pm$ 2265	52087 <sup>b</sup> $\pm$ 5126	10087 <sup>c</sup> $\pm$ 315	16615 <sup>b</sup> $\pm$ 1494
11	4688 <sup>bc</sup> $\pm$ 150	1581 <sup>c</sup> $\pm$ 36	1084 <sup>c</sup> $\pm$ 43	35407 <sup>b</sup> $\pm$ 737	51531 <sup>b</sup> $\pm$ 3834	7865 <sup>d</sup> $\pm$ 534	15604 <sup>b</sup> $\pm$ 582
15	4393 <sup>c</sup> $\pm$ 433	1475 <sup>d</sup> $\pm$ 55	938 <sup>de</sup> $\pm$ 46	31399 <sup>c</sup> $\pm$ 1698	45309 <sup>c</sup> $\pm$ 3405	8776 <sup>d</sup> $\pm$ 741	13859 <sup>c</sup> $\pm$ 1765

Nota: <sup>abc</sup>: letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras. CFT: Composição fenólica total. TE: Trolox equivalente. \*: expresso em miligrama de ácido 5-cafeoilquínico equivalente por quilograma de bagaço desidratado (mg ACQ/kg). \*\*: expresso miligrama de (+)-catequina equivalente por quilograma de bagaço desidratado (mg CAT/kg). \*\*\*: Expresso em micromol de trolox equivalente por quilograma de bagaço desidratado ( $\mu\text{mol TE/kg}$ ).

Os compostos fenólicos individuais identificados e quantificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no bagaço *in natura* pertencem às classes: dihidrochalconas (floreтина-2'-β-D-glucosídeo), ácidos fenólicos (ácido 5-cafeoilquínico) e flavonóis (quercetina-3-rutinosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo e quercetina-3-O-ramnosídeo) (Figura 2.5). Todos os compostos apresentaram o mesmo comportamento decrescendo no primeiro dia de fermentação e se mantendo constante após este período. Provavelmente, após o primeiro dia de fermentação, ocorreu a saturação do meio líquido, o que cessou a extração dos compostos do bagaço. Dessa forma, mesmo mantendo o bagaço em contato com a fase líquida por um tempo maior, a extração ocorreu apenas até atingir o equilíbrio entre a concentração fenólica da fase líquida (sidra) e da fase sólida (bagaço).

Todos os compostos fenólicos individuais identificados no bagaço diminuíram no decorrer da fermentação ( $p < 0,05$ ), conforme apresentado na Figura 2.5. Neste experimento, a floretina-2'-β-D-glucosídeo foi o composto em maior destaque, na proporção de 283,05 mg/kg de bagaço desidratado. Após a fermentação, a quantidade de floretina-2'-β-D-glucosídeo no bagaço foi de 92,74 mg/kg.

O ácido 5-cafeoilquínico, considerado principal ácido fenólico das maçãs, esteve presente na quantidade de 196,06 mg/kg no bagaço desidratado. No final da fermentação, o bagaço apresentou 85,59 mg/kg, o que resulta em uma extração de 5,22 mg para a sidra, considerando a proporção de bagaço utilizado por litro de mosto. A sidra II apresentou apenas 2,98 mg/L a mais de ácido 5-cafeoilquínico comparado a sidra I, deste modo, o restante (2,24 mg/L) provavelmente esteve envolvido em reações químicas, tais como a clivagem, que forma o ácido caféico e o ácido quínico, por exemplo (MADRERA; LOBO; VALES, 2006; YE; YUE; YUAN, 2014).

Os flavonóis determinados no bagaço foram a quercetina-3-rutinosídeo, 144,42 mg/kg; quercetina-3-D-galactosídeo, 91,01 mg/kg; e quercetina-3-O-ramnosídeo, 48,98 mg/kg. Geralmente, os flavonóis estão em abundância na casca de maçãs (ALBERTI et al., 2017), sendo pouco extraídos para sucos e mostos, o que faz com que se destaquem no bagaço. Ito et al (2016), Suárez et al. (2010) e Lavelli e Corti (2011) também encontraram flavonóis como principal classe de compostos fenólicos no bagaço de maçã. Dihidrochalconas constituíram a segunda classe de maior importância, segundo os mesmos autores. Após a fermentação esses valores diminuíram para 76,34 mg/kg, 12,52 mg/kg e 35,91 mg/kg de quercetina-3-rutinosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo e quercetina-3-O-ramnosídeo, respectivamente. Esses compostos foram recuperados uma vez que eram encontrados em

quantidades muito pequenas no mosto, e foram extraídos do bagaço durante a fermentação da sidra.

Os compostos fenólicos individuais apresentaram correlação com as atividades antioxidante (Tabela 2.6) determinadas por ABTS, FRAP e DPPH ( $p < 0,01$ ). Apenas o método de CUPRAC para determinação da atividade antioxidante *in vitro* não apresentou correlação com os compostos fenólicos individuais ( $p \geq 0,05$ ). A floretina-2'- $\beta$ -D-glucosídeo, o ácido 5-cafeoilquínico e a quercetina-3-rutinosídeo foram os compostos de maior correlação com a atividade antioxidante ( $r \geq 0,72$ ). Raudone et al. (2016) observaram que o ácido 5-cafeoilquínico é um dos principais compostos que contribuem (em até 36%) para o aumento da atividade antioxidante de maçãs em pó, utilizando os métodos de FRAP e ABTS. A correlação entre a concentração de ácido 5-cafeoilquínico e as atividades antioxidantes determinadas pelos mesmos autores foi acima de 0,61. A floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo, por sua vez, não apresenta alta atividade antioxidante, entretanto sua alta concentração faz com que tenha maior influência na atividade antioxidante em relação a outros compostos (ALBERTI et al., 2017; ALVAREZ et al., 2017).

Os flavonóis individuais, quercetina 3-rutinosídeo, quercetina 3- $\beta$ -D-glucosídeo e quercetina 3-O-raminosídeo, identificados nos extratos do bagaço, apresentaram correlação com a atividade antioxidante ( $p < 0,05$ ). A quercetina 3-rutinosídeo e a quercetina 3- $\beta$ -D-glucosídeo apresentaram correlação acima de 0,64, entretanto, a quercetina 3-O-raminosídeo apresentou menores valores de correlação ( $r \geq 0,43$ ). A correlação mais baixa entre flavonóis e a atividade antioxidante ocorre devido às glicosilações do radical hidroxila das quercetinas, o que diminui a atividade antioxidantes destes compostos (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; ALVAREZ et al., 2017).

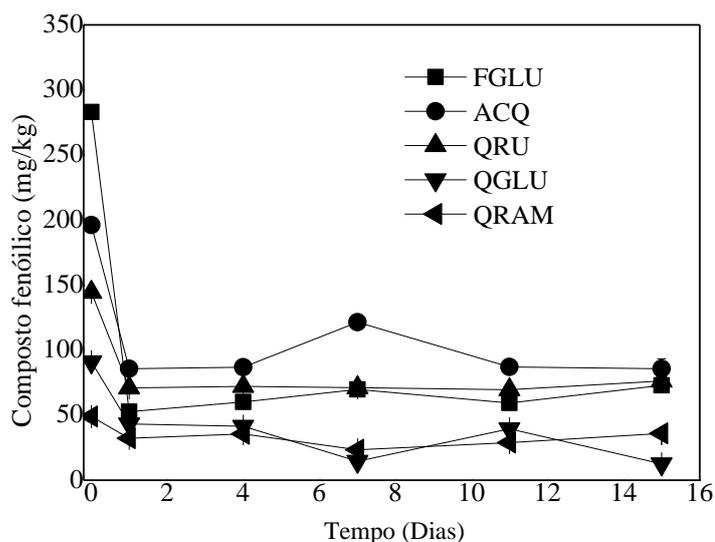


Figura 2.5: Composição fenólica individual dos bagaços durante a fermentação.  
 Nota: FGLU: Floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo. ACQ: Ácido 5-cafeoilquínico. QRU: Quercetina 3-rutinosídeo. QGLU: Quercetina 3- $\beta$ -D-glucosídeo. QRAM: Quercetina 3-O-raminosídeo.

Tabela 2.6: Correlação de Pearson entre composição fenólica individual e atividade antioxidante *in vitro*.

Composto fenólico	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>		
	ABTS	DPPH	FRAP
Floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo	r = 0,97 p < 0,01	r = 0,95 p < 0,01	r = 0,72 p < 0,01
Ácido 5-cafeoilquínico	r = 0,95 p < 0,01	r = 0,91 p < 0,01	r = 0,72 p < 0,01
Quercetina 3-rutinosídeo	r = 0,96 p < 0,01	r = 0,95 p < 0,01	r = 0,74 p < 0,01
Quercetina 3- $\beta$ -D-glucosídeo	r = 0,88 p < 0,01	r = 0,89 p < 0,01	r = 0,70 p < 0,01
Quercetina 3-O-raminosídeo	r = 0,76 p < 0,01	r = 0,81 p < 0,01	r = 0,57 p < 0,01

### 2.3.5 IMPACTO NA ANÁLISE SENSORIAL DAS SIDRAS

Segundo a literatura, o processo de maceração das uvas pode proporcionar amargor e adstringência, além de alterações indesejáveis na cor e no aroma dos vinhos, devido a extração excessiva de compostos fenólicos (OLEJAR; FEDRIZZ; KILMARTIN, 2015a;

2015b). Da mesma forma, a utilização do bagaço imobilizado de maçã pode influenciar na percepção sensorial de sidras.

De acordo com a avaliação sensorial, a sidra II foi mais amarga, o que provavelmente está relacionado ao aumento da composição fenólica da mesma (Figura 2.6). Embora a sidra II tenha sido caracterizada com maior acidez e pH mais baixo nas análises químicas, a percepção da acidez foi menor para esta sidra, comparada a sidra I. Neste caso, a percepção da acidez pode ter sido reduzida devido aos açúcares residuais e a quantidade de sorbitol, um poliálcool de poder edulcorante, que foi produzido durante a fermentação. A adstringência foi avaliada como igual para as duas amostras. Dessa forma, a utilização do bagaço imobilizado não teve influência neste parâmetro. A cor, assim como observada na análise instrumental, foi mais clara na sidra II.

Symoneaux et al. (2014) estudaram a influência das procianidinas nos atributos sensoriais, observando que estes compostos influenciam no aumento do amargor e da adstringência, porém não tem influência na acidez e doçura de sidras. Conforme observado no item 2.3.2, os flavanóis (possivelmente procianidinas não identificadas na composição fenólica individual) compreenderam os flavonoides que mais aumentaram após a fermentação da sidra II, o que pode ter influenciado no aumento do amargor. Olejar; Fedrizzi e Kilmartin (2015b) também observaram diferenças sensoriais em vinhos *Suavignon Blanc* produzidos pelo processo de maceração, os quais foram mais amargos e adstringentes, provavelmente influenciado pela extração dos compostos fenólicos da casca, em especial os flavan-3-óis.

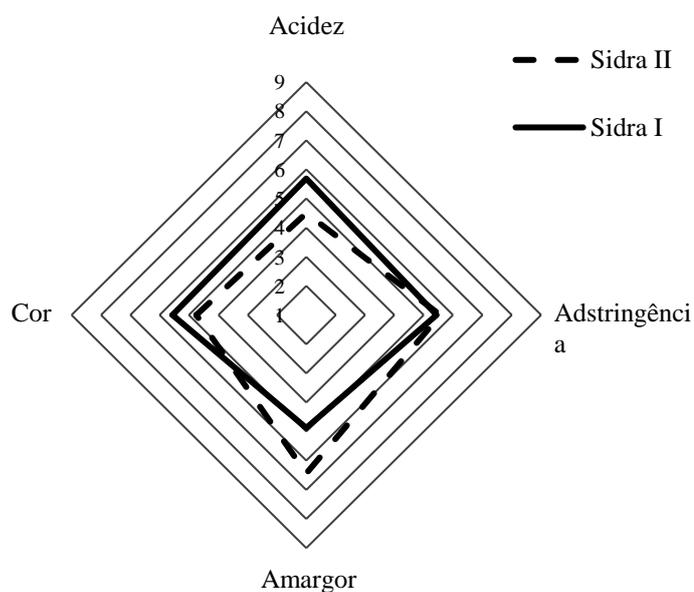


Figura 2.6: Diferenças nos atributos sensoriais descritivos das sidras I e II.

As quantidades de fenóis e de etanol e glicerol produzidas influenciam diretamente na formação de aromas dos vinhos Olejar; Fedrizzi e Kilmartin (2015b). A avaliação para o atributo de qualidade do odor indicou que as sidras I e II tiveram boa aceitação, se mantendo em um intervalo entre gostei ligeiramente e gostei moderadamente, com notas 6,2 e 6,7, respectivamente. Isso indica que a fermentação com adição do bagaço imobilizado não influenciou na percepção do odor da bebida.

## 2.4 CONCLUSÃO

A composição fenólica e a atividade antioxidante *in vitro* de sidras foi melhorada com a adição de bagaço imobilizado durante a fermentação. Os principais compostos extraídos foram os flavonóis, principal fração retida no bagaço, os quais são responsáveis pela coloração amarela das sidras. A sidra tende a ser mais clara que o suco, entretanto, a fermentação com bagaço proporcionou uma clarificação maior ainda. O bagaço apresentou menor quantidade de fenóis totais e maior quantidade de nitrogênio total após a fermentação, devido à extração desses compostos e a retenção de leveduras no meio. As sidras foram sensorialmente bem aceitas em termos de qualidade de odor, uma vez que a média das notas de ambas as sidras indicaram que os julgadores gostei ligeiramente a moderadamente dos produtos. Dos atributos que distinguem as amostras, a cor da sidra II foi mais clara, em termos de gosto a sidra II foi mais amarga, a acidez foi mascarada devido a presença de açúcares residuais e sobitol, e as duas sidras não apresentaram diferenças termos de adstringência.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do bagaço de maçã imobilizado durante a fermentação alcoólica de sidras foi eficaz na recuperação dos compostos fenólicos, o que além de reutilizar o subproduto, aumenta a atividade antioxidante das bebidas.

Foi observado que no decorrer da fermentação alguns compostos foram formados, como por exemplo os ácidos cafeico e *p*-cumárico, que provém da clivagem do ácido 5-cafeoilquínico e da ação da enzima esterase nas leveduras, respectivamente. Outros compostos, presentes tanto no bagaço como na sidra, como floretina 2'- $\beta$ -D-glucosídeo, ácido 5-cafeoilquínico e quercetina 3-rutinosídeo, aumentaram com a utilização do bagaço imobilizado, ao passo que outros glucosídeos de quercetina foram extraídos exclusivamente do bagaço.

A análise do perfil sensorial das sidras indicou que a fermentação com bagaço imobilizado modifica a cor da sidra, a qual teve maior luminosidade. Além disso, a sidra fermentada com bagaço foi mais amarga e menos ácida, ao passo que a adstringência foi igual para ambas as sidras.

Portanto, este trabalho pode afetar o setor de produção de sidras brasileiras, de modo que melhora a composição destes produtos. Sobretudo, pode ser interessante para pesquisas futuras e para desenvolvimento de outros produtos com compostos antioxidantes, visando um apelo funcional ou melhoria da qualidade.

## REFERÊNCIAS

ÁJILA, 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, 2012.

ALBERTI A, VIEIRA RG, DRILLEAU JF, WOSIACKI G, NOGUEIRA A. Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 54, p. 551-558, 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.; 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, p. 1511 – 1518, 2017.

ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151-158, 2014.

ALONSO-SALCES, R. M.; KORTA, E.; BARRANCO, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3761 – 3767, 2001.

ALVAREZ, L. V. H.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Monitoring of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of apple beverages according to geographical origin and their type: a chemometric study. **LWT – Food Science and Technology**, v. 84, p. 385 – 393, 2017.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. AOAC International, 2005.

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

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.

ASHEBIR, D.; DECKERS, T.; NISSEN, J.; BIHON, W.; TSEGAY, A.; TEKIE, H.; POESEN, J.; HAILE, M.; WONDUMAGEGNEHEU, F.; RAES, D.; BEHAILU, M.; DECKERS, J. Growing apple (*Malus domestica*) under tropical mountain climate conditions in Northern Ethiopia. **Experimental Agriculture**, v. 46, p. 53 – 65, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. **Braslian Apple Yearbook**, 2015. Disponível em: <http://www.abpm.org.br>, acesso em 20 jun 2016.

BABU, P. V. A.; LIU, D.; GILBERT, E. Recent advantages in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1777-1789, 2013.

BAI, X.; ZHANG, H.; REN, S. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace. **Journal Science and Food Agriculture**, v. 93, p. 2502 – 2506, 2012.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 04, p. 629-643, 2010.

BASSO, T. O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPÍRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLOG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, G. M.; GOMBERT, A. K.; MARIS, J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B.U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolisms *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 694-703, 2011.

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**, New York, v. 239, n. 1, p.70-76, 1996.

BIMPILAS, A.; TSIMOGIANNIS, D.; 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.

BLUMBERG, J. B.; VITA, J. A.; OLIVER CHEN, C-Y. Concord grape juice polyphenols and cardiovascular risk factors: dose-response relationships. **Nutrients**, v. 7, p. 10032 – 10052, 2015.

BOIVIN, S.; ALEXANDRE, H.; FEIULLAT, M.; CHARPENTIER, C. Relative cell wall porosity assay using monomeric and polymeric cations in *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in grape juice. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 6, p. 471 – 475, 1998.

BONNEU, M.; CROUZET, M.; UKDACI, M.; AIGLE, M. Direct detection of yeasts mutants with reduced viability on the plates by erithosine B staining. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p. 225 – 230, 1991.

BOSSE, A. K.; FRAATZ, M. A.; ZORN, H. Formation of complex natural flavor by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2952 – 2959, 2013.

BOYER, J.; LIU, R. H. Apples phytochemicals and their health benefits. **Nutrition Journal**, v. 3, n. 1, 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**, n. 141, p. 967- 974, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; COUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, 28, 25-30, 1995.

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: 08 ago. 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: 08 ago. 2016.

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.

BUSHAN, S.; KALIA, K.; SHARMA, M.; SING, B.; AUJA, P. S. Processing of apple pomace for bioactive molecules. **Critical Reviews in Biotechnology**, 28, p. 285–296, 2008.

CAMPOS, C.; GUZMÁN, R.; LÓPEZ-FERNANDÉZ, E.; CASADO, A. Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproine disulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRAC-BSC assay. **Analytical Biochemistry**, v. 392, p. 37-44, 2009.

CARVALHO, J. R. F.; SILVA, K. M.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Elaboração de fermentado de maçã com características semelhantes a sidra francesa. Boletim do centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 28 , n. 01, p. 97 – 114, 2010.

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.

CETNARSKI FILHO, R.; CARVALHO, R. I. N.; MARTIN, V. C. Caracterização da maçã brasileira comercializada em Curitiba e região metropolitana. **Revista acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 1, p. 21 – 27, 2008.

CHAGAS, E. A.; CHAGAS, P. C.; PIO, R.; BETTIOL NETO, J. E.; SANCHES, J.; CARMO, S. A.; CIA, P.; PASQUAL, M.; CARVALHO, A. S. Produção e atributos de qualidade de cultivares de macieira nas condições subtropicais da região Leste paulista. **Ciência rural**, v. 42, n. 10, p. 1764 – 1769, 2012.

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

CLYDESDALE, F. M. Color as a factor in food choice. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 83–101, 1993.

CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and *in vitro* methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 148 – 173, 2012.

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

DJIKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 199 – 224, 1986.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: PUCPress, 2015, 531 p.

EMBRAPA. **Pera, maçã e caqui: o futuro da agricultura no Nordeste**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/.../pera-maca-e-caqui-o-futuro-da-agricultura-no-nordeste>>. Acesso em 28 jan 2018.

ERKAN-KOÇ, B.; TURKYLMAZ, M.; YEMIS, O.; OSKAN, M, Effect of various protein- and polysaccharide- based clarification agents on antioxidative compounds and colour of pomegranate juice. **Food Chemistry**, v. 184, p. 37-45, 2015.

FABIO, A. C. **Maçã foge do frio e começa a ser produzida também no Nordeste brasileiro**. (2013). Disponível em: <<http://economia.uol.com.br/agronegócios>>. Acesso em 28 jan 2018.

FAOSTAT (2016). FAO Statistical Database. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>> Acesso em 01 mar 2017.

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

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

FLOEGEL, A.; KIM, D-O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K.; Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

GASSARA, F.; AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAG, R. D.; VALERO, J. R. Liquid state fermentation of Apple pomace sludge for the production of lignolytic enzymes and liberation of polyphenolic compounds. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 999 – 1004, 2012.

GHINEA, R.; PEREZ, M.; HERRERA, L. J.; RIVAS, M. J.; YEBRA, A.; PARAVINA, R. D. Colour difference threshold in dental ceramics. **Journal of Food Dentistry**, v. 385. P. e57 – e64, 2010.

GOMES, T. A.; SALVADOR FILHO, M. R.M.; 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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HEINMAA, L.; MOOR, U.; PÖLDMA, P.; RAUDSEPP, P.; KIDMOSE, U.; LO SCALZOE, R. Content of health-beneficial compounds and sensory properties of organic apple juice as affected by processing technology. **LWT – Food Science and Technology**, v. 85, p. 372 – 379, 2017.

HERALD, T. J.; GADGIL, P.; TILLEY, M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2326 – 2331, 2012.

HERRERO, M.; NORIEGA, E.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Influence of malolactic starter on the quality of the cider produced on an industrial scale. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 168-174, 2005.

ITO, V. C.; ALBERTI, A.; AVILA, S.; SPOTO, M.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Effects of gamma radiation on the phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of apple pomace flour during storage using multivariate statistical techniques. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 251-259, 2016.

KAMARAN, S.; TÜTEM, E.; BASKAN, K. S.; APAK, R. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1201-1209, 2010.

KAMMERER, D. R.; KAMMERER, J.; VALET, R.; CARLE, R. Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. **Food research international**, v. 65, p. 2-12, 2014.

KENNEDY, M.; LIST, D.; LU, Y.; FOO, L. Y.; NEWMAN, R. H.; SIMS, I. M.; BAIN, P. J. S.; HAMILTON, B.; FENTON, G. **Apple pomace and products derived of apple pomace: uses, composition and analysis**. Modern Methods of Plants Analysis, v. 20, p. 75-119, 1999.

KHANIZADEH, S.; TSAO, R.; REKIKI, D.; YANG, R.; CHARLES, M. T.; VASANTHA RUPASINGHE, H. P. 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. J. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **LWT – 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.

LATA, B.; TRAMPCZYNSKA, A.; PACZESNA, J. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. **Scientia Horticulturae**, p. 176-181, 2009.

LAVELLI, V.; CORTI, S. Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. **Food Chemistry**, 129, 1578 – 1583, 2011.

LAVELLI, V.; KERR, W. Apple pomace is a good matrix for phytochemical retention. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5660 – 5666, 2012.

LE BOURVELLEC, C.; LÉ QUÉRÉ, J.-M.; RENARD, C. M. G. C. Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit juice: studies in model suspensions and applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7896 – 7904, 2007.

LE DEUN, E.; WERF, R. V. d.; LE BAIL, G.; LE QUÉRÉ, J.-M., GUYOT, S. HPLC-DAD-MS profiling of polyphenols responsible for the yellow-orange color of apple juices of different French cider apple variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 7675 - 7684, 2015.

LE QUÉRÉ, J. M. L.; HUSSON, F., RENARD, C. M. G. C.; PRIMAULT, J. French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. **LWT -Food Science and Technology**, v. 39, p. 1033-1034, 2006.

LINK, A.; BALAGUER, F.; BOEL, A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1771 – 1792, 2010.

LIU, C.; HAN, M.; ZHANG, L. The effects of fertilizer application at early summer on growth yield and quality of Fuji apple in Weibei Highland. **Agricultural Research**, v. 4, p. 63 – 65, 2012.

LOPES, P. R. C; OLIVEIRA, I. V. M.; SILVA, R. R. S.; CAVALCANTE, I. H. L. Growing Princessa apples under conditions in northastern Brazil. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, n. 51, p. 93 – 99, 2013.

LOS, P. R.; BRAGA, C. M.; CARVALHP, J. R. F.; SIMÕES, D. R. S.; NOGUEIRA, A. Aplication of sensory analysis in the development of a new apple cider. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 10, n. 1, p. 2150 – 2168, 2017.

LUKIC, I.; LOTTI, C.; VRHOVSEK, U. Evolution of free and bound volatile aroma compounds and phenol during fermentation of Muscat blanc grape juice with and without skins. **Food Chemistry**, 232, p. 25-35, 2017.

MADRERA, R. R.; BREDIÑANA, R. P.; HEVIA, A. G.; ARCE, M. B.; VALLES, B. S. production of spirits from dry apple pomace and selected yeasts. **Food and Bioproducts processing**, v. 91, p. 623 – 631, 2013.

MADRERA, R. R.; BREDIÑANA, R. P.; VALLES, B. S. Enhancement of the nutritional properties of apple pomace by fermentation with autochthonous yeasts. **LWT – Food Science and Technology**, v. 79, p. 27 – 33, 2017.

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

MADRERA, R. R.; LOBO, A. P.; VALLES, B. S. Phenolic profile of Austrians (Spain) natural cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 120 – 124, 2006.

MADRERA, R. R.; VALLES, N. D. Determination of volatile compounds in apple pomace by Stir Bar extraction and gas chromatography-mass spectrometry (SBSE – GC – MS). **Journal of Food Science**, v. 76, p. c1326 – c1334, 2011.

MAGYAR, M.; SOUSA, L. C.; JIN, M.; SARKS, C.; BALAN, V. Conversion of apple pomace waste to ethanol at industrial relevant conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, p. 7349 – 7358, 2016.

MAINENTE, F.; RIZZI, C.; ZOCCATELLI, G.; CHIGNOLA, R.; SIMONATO, B.; PASINI, G. Setup of a procedure for ciders proteins recovery and quantification. **European Food Research and Technology**, v. 242, p. 1803 – 1811, 2016.

MALEC, M.; LÉ QUÉRÉ, J-M.; SOTIN, H.; KOŁODZIEJCZYK, K.; BALDUIN, R.; GUYOT, S. Polyphenol profiling of a red-flashed apple cultivar and evaluation of the color extractability and stability in the juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, 6944-6954, 2014.

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.

MIR, S. A.; DON BOSCO, S. J.; SHAH, M. A.; SANTHALAKSHMY, S.; MIR, M. M. Effect of apple pomace on quality characteristics of brown rice based cracker. **Journal of Food Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, p. 25 – 32, 2017.

MIRANDA, J. M. S.; CAVALCANTE, I. H. L.; OLIVEIRA, I. V. M.; LOPES, P. R. C.; ASSIS, J. S. Fruit quality of ‘Eva’ and ‘Princesa’ apples grown under nitrogen fertigation in semiarid climate. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 10, p. 967 – 972, 2015.

MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GOMEZ-CORDOVÉZ, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 85 – 118, 2007.

MORATA, A.; GÓMEZ-CORDOVÉZ, M. C.; SUBERVIOLA, J.; BARTOLOMÉ, B.; COLOMO, B.; SUÁREZ, J. A. Adsorption of anthocyanins by yeasts cell walls during the

fermentation of red wines. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v. 51, p. 4084 – 4088, 2003.

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

NJUNGA, J. K.; LEONARD, S. W.; TEDDY, E. M. Temperate fruits production in the tropics: a review on apples in Kenya. **Hortscience**, v. 39, p. 841, 2004.

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

NOGUEIRA, A.; GUYOT, S.; MARNET, M.; LEQUERÉ, 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. 1201-1209, 2008.

NOGUEIRA, A.; JASTER, H.; WOSIACKI, G.; DEMIATE, I. M.; BELTRAME, F. L.; ZARDO, D. M. **Processo tecnológico para aproveitamento de bagaço e maçã: extração de compostos fenólicos funcionais e enriquecimento proteico durante a fermentação alcoólica do mosto de maçãs**. PI015110002826, 12 nov. 2011.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; SIMÕES, D. R.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos da qualidade da sidra brasileira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 289 – 298, 2003.

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

OLEJAR, K. J.; FEDRIZZI, B.; KILMARTIN, P. A. Antioxidant activity and phenolic profiles of Suavignon Blanc wines made by various maceration techniques. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 21, n. 1, p. 57 – 68, 2015b.

OLEJAR, K. J.; FEDRIZZI, B.; KILMARTIN, P. A. Enhancement of Chardonnay antioxidant activity and sensory perception through maceration technique. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65, p. 152 – 157, 2015a.

OLEJAR, K. J.; FEDRIZZI, B.; KILMARTIN, P. A. Enhancement of Chardonnay antioxidant activity and sensory perception through maceration technique. **LWT – Food Science and Technology**, v. 65., p. 152 – 157, 2016.

OLIVEIRA, D. L.; ALVARENGA, A. A.; GONÇALVES, E. D.; MALTA, M. R. Qualidade de maçã cv. Eva produzida em duas regiões de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 269 – 272, 2014.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051 – 1056, 2011.

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

PAEPE, D.; SERVAES, K.; NOTEN, B.; DIELS, L.; LOOSE, M.; VAN DROOGENBROECK, S.; VOORSPOELS, S. An improved mass spectrometric method for identification and qualification of phenolic compounds in apple fruits. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 368-375, 2013.

PAMAR, I.; SHARMA, S.; VASANTHA RUPASINGHE, H. P. Optimization of  $\beta$ -cyclodextrin-based flavonol extraction from apple pomace using response surface methodology. **Journal Food and Science Technology**, v. 52, p. 2202 – 2210, 2015.

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

PATHAK, L.; AGRAWAL, Y.; DHIR, A.; Natural polyphenols in the management of major depression. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 22, p. 863 – 880, 2013.

PIETROWSKI, G. A. M.; SANTOS, C. M. E.; SAUER, E.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. Yeast on the volatile profile of fermented apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9815-9821, 2012.

RAUDONE, L.; RAUDONIS, R.; LIAUDANSKAS, M.; VISKELIS, J.; PUKALSKAS, A.; JANULIS, V. Phenolic profiles and contributions of individuals compounds to antioxidant activity of apple powders. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 5, p. 1055 – 1061, 2016.

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

REIS, S. F.; RAI, D. K.; ABU-GANNAM, N. Apple pomace as a potential ingrediente for the development of new functional foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 1743-1750, 2014.

RENARD, C. M. G. C.; DUPONT, N.; GUILLERMIN, P. Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. **Phytochemistry**, p. 1128 – 1138, 2007.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 1999..

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. **Efeito da relação das fases líquida e sólida da uva na composição química e na característica sensorial do vinho Cabernet**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 1999.

ROSSINI, K.; ANZANELLO, M. J.; FOGLIATTO, F. S. Seleção e atributos em avaliações sensoriais descritivas. **Produção**, v. 22, n. 3, p. 380-390, 2012.

ROZA, C.; LACA, A.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1451-1453, 2003.

SALAMEH, D.; BRANDAM, C.; MEDAWAR, W.; LTEIF, R.; STREIHAIANO, P. Highlights on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1661 – 1667, 2008.

SANTOS, C. M. E.; PIETROWSKI, G. A. M.; BRAGA, C. M.; ROSSI, M. J.; NINOW, J.; SANTOS, T. P. M.; WOSIACKI, G.; JORGE, R. M. M.; NOGUEIRA, A. Apple aminoacid profile and yeast strains in the formation of fusel alcohols and esters in cider production. **Food Chemistry**, v. 80, n. 6, 2015.

SATO, M. F.; VIEIRA, R. G.; ZARDO, D. M.; FALCÃO, 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.; ENDREB, H-U.; RENTSCHLER, C.; CARLE, R. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. **Innovative in Food Science and Emerging Technology**, v. 4, p. 99 – 107, 2003.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 67 – 103, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Florida: CRC Press, 2004, p. 558.

SHALINI, R.; GUPTA, D. K. Utilization of pomace from apple processing industries: a review. **Journal Food and Science Technology**, p. 365-371, 2010.

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

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

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 and Science Technology**, v. 57, p. 28-34, 2014.

SYMONEAUX, R.; CHOLLET, S.; PATRON, C.; BALDUIN, R.; LE QUÉRÉ, J-M.; BARON, A. Prediction of sensory characteristics of cider according to their biochemical composition: use of a central composite design and external validation by cider professionals. **LWT – Food Science and Technology**, v. 61, p. 63 – 69, 2015.

TESFAYE, W.; MORALES, M. L.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Improvement of wine vinegar elaboration and quality analysis: instrumental and human sensory evaluation. **Food Reviews International**, v. 25, p. 142-156, 2009.

TORRES, B.; TIWARI, B. K.; PATRAS, A.; WIJINGAARD, A. H.; BRUNTOS, N.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Effect of ozone processing on the colour, rheological properties and phenolic content of apple juice. **Food Chemistry**, v. 124, p. 171-726, 2011.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E. KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contributes to total antioxidant activity of apples? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4989 – 4995, 2005.

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

VILLAR, A.; VADILLO, J.; SANTOS, J. I.; GORRITXATEGI, E.; MABE, J.; ARNAIZ, A.; FERNÁNDEZ, L. A. Cider fermentation process monitoring by VIS-NIR sensor system and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 221, p. 100 – 106, 2017.

YASSIN, L. S.; ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; OLIVEIRA-EMILIO, H. R.; NOGUEIRA, A. Cytoprotective effect of phenolic extracts from Brazilian apple peel in insulin-producing cells. **Current nutrition and Food Science**, v. 13; p. 1-7, 2017.

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

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

ZARDO, D. M.; SILVA, K. M.; GUYOT, S.; NOGUEIRA, A. Phenolic profile and antioxidant capacity of the principal apples produced in Brazil. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 64; n. 5, p. 611-620, 2013.

ZARDO, D. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Science**, v. 6, p. 227-235, 2015.

ZIAULLAH, S. K.; BHULLAR, S. N.; SUMUSU, W. N.; VASANTHA-RUPASINGHE. Biocatalytic synthesis, structural elucidation, antioxidant activity and tyrosinase inhibition activity of long chain fatty acid acylated derivatives of phloridzin and isoquercitrin. **Bioorganic & Medical Chemistry**, 21, p. 684-692, 2013.

ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; BRAGA, C. M.; SILVA, K. M.; CANTERI, M. H. G.; MAFRA, L. I.; GRANATO, D.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Effect of mash maceration and ripening stage of apples on phenolic compounds and antioxidant power of cloudy juices: a study using chemometrics. **LWT -Food Science and Technology**, v. 57, p. 223-229, 2014.

ZUCOLOTO, M.; KU, K-M.; KUSHAD, M. M.; SAWWAN, J. Bioactive compounds and quality characteristics of five apples cultivars. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 1972-1979, 2015.

ZURIARRAIN, A.; ZURIARRAIN, J.; PUERTAS, A. I.; DUEÑAS, M. T.; OSTRAL, M. BERREGI, I. Polyphenolic profile in cider and antioxidant power. **Journal of the Science of the Food and Agriculture**, v. 95, n. 14, p. 2931 – 2943, 2014.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A: Parâmetros cromatográficos dos padrões de açúcares e etanol.

Padrão	TR (min)	Curva	R <sup>2</sup>	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Sacarose	8,001	Y=943272X+24168	0,996	0,085	0,256
Glucose	9,702	Y=962786X-2742,3	0,999	0,009	0,028
Frutose	12,180	Y=924363X+56060	0,999	0,235	0,713
Etanol	14,609	Y=317019X+56005	0,989	0,583	1,767
Sorbitol	19,10	Y=827900X+47355	0,990	0,189	0,256

Nota: TR: Tempo de retenção (min). LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação.

### APÊNDICE B: Parâmetros cromatográficos dos padrões de compostos fenólicos.

Composto	TR (min)	Banda UV (nm)	Regressão linear	R <sup>2</sup>	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Ácido 5-cafeolquínico	9,212	326,2	Y=25239X-13322	0,997	0,59	1,80
Ácido p-cumárico	15,522	310,7	Y=61187X-85345	0,998	0,52	1,59
Ácido cafeico	10,923	323,8	Y=39960X+80223	0,984	0,07	0,20
(+)-Catequina	8,713	279,8	Y=5599,4X-9084,7	0,999	0,99	2,99
(-)-Epicatequina	12,816	279,8	Y=5672,4X+23297	0,991	6,11	18,50
Floretina 2'-β-D glucosídeo	24,502	285,8	Y=17194X-30986	0,997	1,28	3,86
Procianidina B2			Y=5684,6X+6661	0,998	0,52	1,58
Quercetina 3-rutinosídeo	18,734	354,9	Y=14303X-72994	0,998	0,50	1,52
Quercetina 3-D galactosídeo	18,992	354,9	Y=14225X-2367,6	0,999	0,29	0,89
Quercetina 3-β-D glucosídeo	19,55	354,9	Y=22090X-59247	0,998	0,03	0,08
Quercetina O-α-L-arabinofuranosídeo	21,16	353,7	Y=19875X-29203	0,998	0,29	0,89
Quercetina 3-O raminosídeo	21,959	348,9	Y=20504X-34188	0,989	0,15	0,46

### APÊNDICE C: Ficha utilizada para familiarização dos julgadores com a escala do atributo acidez.

Nome: _____	Data: _____										
<p>Você está recebendo amostras codificadas de fermentado de maçã. Por favor, prove-as e ordene-as conforme escala apropriada quanto à intensidade de acidez.</p>											
<p>Amostra:</p> <table style="width: 100%; text-align: center; border: none;"> <tr> <td style="width: 20%;"><u>    </u> ①</td> <td style="width: 20%;"><u>    </u> ③</td> <td style="width: 20%;"><u>    </u> ⑤</td> <td style="width: 20%;"><u>    </u> ⑦</td> <td style="width: 20%;"><u>    </u> ⑨</td> </tr> <tr> <td>Muito fraco</td> <td>Fraco</td> <td>Moderado</td> <td>Forte</td> <td>Muito forte</td> </tr> </table>		<u>    </u> ①	<u>    </u> ③	<u>    </u> ⑤	<u>    </u> ⑦	<u>    </u> ⑨	Muito fraco	Fraco	Moderado	Forte	Muito forte
<u>    </u> ①	<u>    </u> ③	<u>    </u> ⑤	<u>    </u> ⑦	<u>    </u> ⑨							
Muito fraco	Fraco	Moderado	Forte	Muito forte							

## APÊNDICE D: Ficha de avaliação sensorial para o atributo acidez.

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 acidez.								
Amostra: _____								
①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
Muito fraco		Fraco		Moderado		Forte		Muito forte
Amostra: _____								
①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
Muito fraco		Fraco		Moderado		Forte		Muito forte
Comentário (obrigatório): _____								
_____								