

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE MONGRUEL ELEUTÉRIO DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DOS AMINOÁCIDOS NA FORMAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS NA
SIDRA**

**CURITIBA
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE MONGRUEL ELEUTÉRIO DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DOS AMINOÁCIDOS NA FORMAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS NA
SIDRA**

Tese do projeto de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito exigido para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof.^a Regina Maria Matos Jorge
Co-orientador: Prof. Dr. Gilvan Wosiacki

**CURITIBA
2015**

S237i

Santos, Caroline Mongruel Eleutério dos

Influência dos aminoácidos na formação dos compostos voláteis na sidra / Caroline Mongruel Eleutério dos Santos. – Curitiba, 2015. 94 f. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

Orientador: Regina Maria Matos Jorge.

Coorientador: Gilvan Wosiacki.

Bibliografia: p. 79-90.

1. Maçã – Produtos. 2. Compostos aromáticos. 3. Aminoácidos. I. Jorge, Regina Maria Matos. II. Wosiacki, Gilvan. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD: 663.2

CAROLINE MONGRUEL ELEUTÉRIO DOS SANTOS

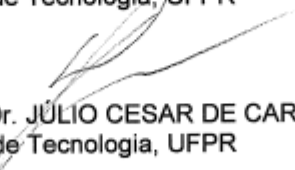
**INFLUÊNCIA DOS AMINOÁCIDOS NA FORMAÇÃO DOS
COMPOSTOS VOLÁTEIS NA SIDRA**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. REGINA MARIA MATOS JORGE
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof.^a. Dr.^a. GIOVANA DE ARRUDA MOURA PIETROWSKI
Campus Ponta Grossa, UTFPR


Prof.^a. Dr.^a. ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. JÚLIO CESAR DE CARVALHO
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. ÁLVARO LUIZ MATHIAS
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 30 de junho de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo e filho, pela alegria de suas existências, e por acreditarem em meu sonho.

Aos meus pais, por acreditarem que eu era capaz e por demonstrar tanto orgulho por esta conquista.

Aos meus sogros, pelo apoio e compreensão.

À Professora Regina Maria Matos Jorge, por acreditar em mim e por depositar confiança durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Professor Alessandro Nogueira, por ser um exemplo de pesquisador e mestre durante minha jornada para esta conquista.

Ao Professor Gilvan Wosiacki, pelo apoio e pelas ideias para este projeto, e também pela paciência e amizade.

À Professora Giovana de Arruda Moura Pietrowski, pelo apoio, carinho e amizade durante esta fase de minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade e apoios durante este projeto.

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

Aos líderes e colegas do Instituto Federal do Paraná, pelo apoio concedido durante este desenvolvimento.

A todos que, de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Sidra é uma bebida fermentada, gaseificada, obtida a partir de maçã. Esta fruta é rica em compostos nitrogenados, sendo que os aminoácidos são os maiores contribuintes. Estes compostos têm sido relatados como precursores diretos ou intermediários na produção de compostos aromáticos em sidras. Desta forma, este trabalho avaliou a influência de aminoácidos na produção de compostos voláteis em sidra, com ênfase na formação de aromas frutados e florais. Foi verificado que, a sidra produzida com mosto de baixo teor de nitrogênio, teve fermentação lenta e produção mais baixa de compostos voláteis quando comparada com mosto com alto teor. Os aminoácidos aspartato, asparagina e glutamato são essenciais para a produção de álcoois superiores e ésteres. Foi avaliada a influência de cada aminoácido majoritário da maçã sobre a formação de ésteres (principais responsáveis pelo aroma frutado e floral da bebida) a partir de um mosto sintético. Foi verificado que a complementação de um mosto com baixo teor de nitrogênio para 120,00 mg/L com 43,44% de aspartato e 56,67% de glutamato produz um teor de ésteres mais elevado, resultando em aroma mais agradável com notas de frutado e floral. O efeito destes aminoácidos foi avaliado para 13 amostras de maçãs produzidas no Brasil para conhecer o perfil das variedades para produção de sidra. A presença e o teor inicial de aminoácidos foram analisados, sendo comprovado que aspartato, asparagina, glutamato e serina são os majoritários. Ainda, ao avaliar os diferentes estádios de maturação verificou-se que nas variedades Gala e Fuji o estágio verde apresentou a concentração total mais alta de aminoácidos, já na variedade Lisgala foram as frutas maduras que apresentaram os maiores teores. Isto posto, este estudo revelou que o aroma frutado e floral em sidra podem ser aumentado com adição de aminoácidos (em um total de 120 mg/L), com destaque para a adição simultânea de aspartato (43%) e glutamato (57%).

ABSTRACT

Cider is a fermented beverage, carbonated, obtained from apple. This fruit is rich in nitrogen compounds, and amino acids are the largest contributors. These compounds have been reported as direct precursors or intermediates in the production of aromatic compounds ciders. Thus, this study evaluated the influence of amino acids in the production of volatile compounds in cider, with emphasis on training of fruity and floral aromas. It was found that the cider produced with low nitrogen content must, presented slow fermentation and lower production of volatile compounds when compared to cider with high content. The amino acid aspartate, asparagine and glutamate are essential for the production of higher alcohols and esters. The influence of each major apple amino acid on the formation of esters (primarily responsible for the floral and fruity aroma of the beverage) was evaluated from a synthetic must. It was found that supplementation of a must with a low nitrogen content to 120.00 mg/L to 43.44% of aspartate and 56.67% of glutamate produces a higher ester content, resulting in more pleasant smell to the notes fruity and floral. The effect of this amino acid was evaluated for 13 samples of apples produced in Brazil to know the profile of varieties for cider production. The presence and the original proportions of amino acids were analyzed, and it was verified that aspartate, asparagine, glutamate and serine are the majority. Still, when evaluating the different stages of maturation was found that the varieties Gala and Fuji green stadium had the highest total concentration of amino acids, as in the variety Lisgala were ripe fruit that had the highest levels. Thus, this study revealed that the fruity and floral aroma cider can be increased with the addition of amino acids (for a total of 120 mg/L), highlighting the simultaneous addition of aspartate (43%) and glutamate (57%) .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Via metabólica de Ehrlich, partindo de um aminoácido para o álcool superior com subsequente esterificação para o acetato.....	22
Figura 1.2	Uma representação esquemática do metabolismo dos compostos voláteis pelas leveduras.....	23
Figure 2.1	Scatter plot PC1 vs. PC2 para identificar as variáveis influenciadas pelas cepas de leveduras e cultivar de maçã.....	41
Figura 3.1	Gráfico de Pareto do perfil de aminoácidos de 13 (treze) diferentes cultivares de maçã.....	51
Figura 4.1	Superfície de resposta da somatória de ésteres do planejamento de misturas.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Compostos voláteis encontrados em algumas cultivares de maçã.....	17
Tabela 2.1	Média de conteúdo dos valores de aminoácidos em mostos de maçã de diferentes cultivares de mesa.....	33
Tabela 2.2	Parâmetros de rotina determinados em mosto de maçã (variedades Gala* e Royal Gala) e sidras produzidas com diferentes cepas comerciais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (com 10 dias de fermentação).....	35
Tabela 2.3	Média \pm desvio padrão (DP) valores de conteúdo de aminoácidos em sidras (mostos de maçã Gala* e Royal) preparados com diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após 10 dias de fermentação alcoólica.....	37
Tabela 2.4	Média \pm desvio padrão (DP) valores de conteúdo de compostos voláteis em mostos de maçã (variedades Gala* e Royal Gala) e sidras produzidas com diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após 10 dias de fermentação alcoólica.....	39
Tabela 3.1	Estatística descritiva de 13 variedades de maçã.....	50
Tabela 3.2	Concentração de aminoácidos em amostras de suco de maçã feitos com as variedades de maçã <i>Fuji Suprema</i> , <i>Lisgala</i> e <i>Gala</i> nos estádios verde, madura e senescente.....	52
Tabela 3.3	Concentração de compostos voláteis das sidras feitas com maçãs das variedades <i>Fuji Suprema</i> , <i>Lisgala</i> ou <i>Gala</i> nos estágios de maturação verde, madura ou senescente.....	55
Tabela 4.1	Planejamento fatorial “simplex-centroid” aumentado para dez tratamentos de misturas de aspartato, glutamato e asparagina.....	64
Tabela 4.2	Parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica de mosto de maçã e mosto sintético de maçã.....	67
Tabela 4.3	Análises físico-químicas de mostos e fermentados sintéticos e de sidras....	67
Tabela 4.4	Concentração de compostos voláteis, no headspace de amostras de mosto de maçã, sidras e fermentados sintéticos com diferentes aminoácidos adicionados separadamente.....	69
Tabela 4.5	Compostos voláteis das diferentes misturas de aminoácidos do planejamento factorial.....	72
Tabela 4.6	Compostos voláteis de sidra de maçã Royal Gala com e sem suplementação de aminoácidos.....	75

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
OBJETIVOS.....	13
OBJETIVO GERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1 AMINOÁCIDOS E COMPOSTOS VOLÁTEIS EM SIDRAS.....	15
1.1 MAÇÃS E SEUS VOLÁTEIS.....	15
1.2 SIDRA.....	17
1.3 COMPOSTOS AROMÁTICOS EM SIDRAS.....	19
1.4 INFLUÊNCIA DOS AMINOÁCIDOS NOS COMPOSTOS AROMÁTICOS.....	20
CAPÍTULO 2 - PERFIL DE AMINOÁCIDOS DA MAÇÃ E CEPAS DE LEVEDURAS NA FORMAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES EM SIDRAS.....	25
RESUMO	26
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1 MATERIAIS.....	29
2.2 PROCESSAMENTO DO MOSTO DE MAÇÃ.....	29
2.3 PROCESSAMENTO DA SIDRA.....	30
2.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS AMINOÁCIDOS.....	30
2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	31
2.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	31
2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4 CONCLUSÃO.....	42
CAPÍTULO 3 - PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE SUCOS E SIDRAS EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO.....	44
RESUMO.....	45
1 INTRODUÇÃO.....	45

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 MATERIAIS.....	47
2.2 PROCESSAMENTO DE SUCO DE MAÇÃ.....	48
2.3 PROCESSAMENTO DO FERMENTADO DE MAÇÃ.....	48
2.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS AMINOÁCIDOS.....	48
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4 CONCLUSÃO.....	57

CAPÍTULO 4 - ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM MOSTOS DE MAÇÃ PARA PADRONIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM SIDRAS.....	58
--	-----------

RESUMO.....	59
--------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO.....	59
--------------------------	-----------

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
----------------------------------	-----------

2.1 MATERIAIS.....	61
2.2 FORMULAÇÃO DO MOSTO SINTÉTICO E DO FERMENTADO SINTÉTICO.....	62
2.3 PROCESSAMENTO DO MOSTO DE MAÇÃ E SIDRA.....	63
2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	63
2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	64
2.6 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS AMINOÁCIDOS.....	65
2.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	65
2.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	66

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	66
---------------------------------------	-----------

4 CONCLUSÃO.....	76
-------------------------	-----------

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
----------------------------------	-----------

REFERÊNCIAS.....	79
-------------------------	-----------

ANEXO I.....	91
--------------	----

ARTIGO ACEITO NA REVISTA “JOURNAL OF FOOD SCIENCE”.....	92
---	----

ANEXO II.....	93
---------------	----

RESUMO APRESENTADO NO “16th IUFOST”.....	94
--	----

INTRODUÇÃO

Compostos voláteis são responsáveis pelo sabor característico dos alimentos, caracterizando o aroma (sensação percebida pelo sentido do olfato), sendo um dos mais importantes atributos dos alimentos e bebidas. Algumas pesquisas afirmam que estes compostos podem ser sintetizados em todas as etapas de produção dos alimentos, estar na matéria prima, ser produzidos nas etapas tecnológicas do produto ou ainda podem ser produzidos durante o armazenamento destes alimentos.

A análise aromática de um alimento é uma fonte valiosa de informação, podendo ser usada no sentido de reconhecer os compostos responsáveis pelo aroma e também para verificar parâmetros para a melhoria no produto. As técnicas analíticas mais comumente empregadas para determinar perfil volátil são cromatográficas, em especial cromatografia a gás.

Existem estudos sendo realizados sobre os precursores destes compostos e como eles são formados, assim como também sobre as condições que maximizem esta produção. Com estas informações seria possível intensificar esta produção, mediante procedimentos tecnológicos (temperaturas de processo, seleção de leveduras, adição de precursores) que valorizam os aromas mais desejados.

As pesquisas atuais têm demonstrado que os aminoácidos são compostos que podem ser considerados precursores dos aromas. Alguns autores afirmam que enriquecendo o mosto com aminoácidos, a formação de compostos voláteis é influenciada significativamente com relação a ésteres e álcoois superiores, compostos responsáveis pela sensação de aroma frutado e floral em bebidas fermentadas de frutas.

A maçã, fruta com elevado consumo / produção no Brasil, tem uma taxa de descarte de 10 a 30% em virtude de defeitos físicos e/ou microbiológicos, que são encaminhadas ao setor agroindustrial de processamento a fim de agregar valor em produtos nobres como sucos, produtos fermentados ou produtos destilados. As sidras têm um consumo restrito a festas de final de ano devido principalmente a baixa qualidade da bebida, resultado de um produto doce e pouco aromático. Assim, a iniciativa de melhorar a qualidade aromática da sidra a fim de se obter um produto com características singulares e atrativas ao paladar brasileiro, torna-se necessária, já que a matéria prima é disponível e a pesquisa nacional tem condições para se chegar a resultados excelentes.

Em algumas pesquisas já foram encontrados mais de 80 compostos voláteis diferentes em maçã e produtos derivados, responsáveis pelo aroma característico, comprovando que esta matéria prima tem potencial para se chegar a um produto fermentado de qualidade superior ao existente atualmente se um processo que realce a formação destes compostos for valorizado.

Desta forma, considerando a necessidade de melhorar e padronizar a qualidade aromática da bebida produzida no Brasil e a necessidade de informações sobre condições de processo que permitam esta padronização justifica-se este trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar os aminoácidos presentes no suco de maçã e analisar a sua influência na formação de compostos voláteis em sidras.

Objetivos específicos

- Analisar o perfil de aminoácidos em sucos de diferentes cultivares de maçãs brasileiras;
- Analisar a influência de leveduras fermentativas no perfil aromático de sidras;
- Formular um mosto sintético com comportamento de fermentação semelhante ao mosto de maçã;
- Avaliar no mosto sintético de maçã a formação de compostos voláteis por leveduras fermentativas testando diferentes aminoácidos de forma isolada;
- Determinar o teor de aminoácido específico para a máxima formação de aroma em mosto sintético de maçã;
- Enriquecer um mosto de maçã com aminoácidos e verificar a influência na formação de compostos voláteis na sidra.
- Fornecer informações sobre a padronização do teor inicial de aminoácidos no mosto de maçã para maximizar a formação de compostos voláteis responsáveis por sensação de aroma frutado e floral na sidra.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DA LITERATURA

1. AMINOÁCIDOS E COMPOSTOS VOLÁTEIS EM SIDRAS

1.1 Maçãs e seus voláteis

A maçã é, dentre as frutas de clima temperado cultivadas no Brasil, aquela que apresentou maior expansão em área plantada e em volume de produção nos últimos vinte anos. Na safra 2012/2013 foram produzidas 1.375.512 toneladas de frutas correspondendo a 39.154 ha de área plantada. A maior concentração do cultivo está na Região Sul, sendo Santa Catarina o maior produtor, com aproximadamente 49,10% do total da área plantada. O Rio Grande do Sul e o segundo estado produtor, com aproximadamente 45,90% do total da área plantada, sendo seguido pelo Paraná com 4,60%. A maior parte da produção provém de duas cultivares: Gala e Fuji, representado 55% e 40% da produção, respectivamente (ABPM, 2014).

No início, o plantio da maçã no Brasil teve como primeiro objetivo suprir o mercado interno para consumo *in natura*, contudo hoje apresenta perspectiva favorável também para sua exportação e para a produção e exportação de suco concentrado. Além do suco, a maçã pode ser aproveitada na elaboração de sidra, vinagre, destilado e extração de pectina (RIZZON; BERNADDI; MIELE, 2005).

A maçã brasileira é um produto bem apreciado pelo mercado europeu, em razão de sua qualidade e também pela época diferente de sua colheita. No ano de 2012, o Brasil exportou mais de 72,3 mil toneladas de maçã (BRASIL, 2013). Entre fruta *in natura* e suco, a maçã já agregava mais de US\$ 30 milhões anuais à receita cambial brasileira, segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Maçã (JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003).

A matéria prima disponível para ser processada pela indústria de transformação provém de maçãs de descarte, oriundas do rigoroso processo de seleção e classificação comercial das maçãs de mesa, necessário para satisfazer as exigências do consumidor brasileiro. Aproximadamente 70% dos frutos rejeitados nestes processos de seleção e classificação, são adequados para o processamento industrial, recebendo o nome de maçãs industriais, sendo que estas mantêm suas propriedades intrínsecas com relação a parâmetros de qualidade como teor de açúcares, ácidos e compostos fenólicos (ABPM, 2014; WOSIACKI, 2001; WOSIACKI; KAMICOGA; NEVES, 1991).

Segundo Gatfield (1995) e Pinheiro e Pastore (2003), os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são: álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos

e outras moléculas complexas. A percepção dos aromas na maçã é o resultado de uma mistura complexa de, principalmente, alguns destes compostos: etanoato de butila, etanoato de 2-metil-butila, etanoato de hexila e hexanoato de hexila, sendo identificados como os maiores responsáveis pelo perfil aromático de muitos cultivares (PLOTTO; MCDANIEL; MATTHEIS, 1999; YOUNG *et al.*, 1996).

O efeito do cultivar é significativo para a maioria das características sensoriais da fruta, inclusive para o perfil aromático. As diferenças são atribuídas principalmente à mudanças estruturais, composição química e atividade enzimática, que difere de uma cultivar para outra (HUBER, 1983).

Young *et al.* (1996) identificaram na maçã Royal Gala 30 compostos voláteis aromáticos, e Mattheis *et al.* (1998) encontraram na maçã intacta do cultivar Gala 20 ésteres voláteis, entretanto somente uma pequena parte destes compostos tem efeito na qualidade sensorial aromática da fruta. Já no suco do cultivar Gala foi encontrado que os compostos majoritários deste cultivar são butanoato de etila, etanoato de butila, etanoato de 2-metil-butila, butanol, hexanoato de etila e hexanol (YOUNG *et al.*, 1999). Segundo Janzanti, Franco e Lanças (2000), na maçã do cultivar Fuji são encontrados 84 compostos aromáticos, sendo que os predominantes são os ésteres. O cultivar Golden Delicious possui uma intensidade aromática que aumenta do período pré-colheita ao pós-colheita, enquanto que, a cultivar Fuji atinge um máximo de compostos voláteis no período de maturidade comercial (MEHINAGIC *et al.*, 2006).

A Tabela 1.1 apresenta os compostos voláteis encontrados em maçãs de diferentes cultivares.

Tabela 1.1 Compostos voláteis encontrados em algumas cultivares de maçã.

<i>Gala</i>	<i>Maçã Rosa</i>	<i>Fuji</i>	<i>Golden Delicious</i>
Etanoato de butila	Ácido tridecanóico	Etanoato de pentila	Etanoato de butila
Etanoato de etila	Ácido fenilacético	Etanoato de isobutila	Etanoato de 2-metil butila
Etanoato de propila	(E)-Álcool cinamílico	Etanoato de 2-metil butila	Etanoato de hexila
Etanoato de pentila	Ácido acético	Etanoato de butila	Etanoato de 2-metil propila
Etanoato de hexila	Álcool benzílico	Etanoato de hexila	Butanoato de 2-metil etila
Ácido acético	Ácido decanóico (ou ác. cáprico)	Etanoato de ciclohexila	Butanoato de 2-metil butila
Benzaldeído	Ácido hexanóico (ou ác. caprónico)	Butanoato de butila	Butanoato de etila
Butanal	Ácido octanóico (ou ác. caprílico)	Butanoato de etila	Butanoato de butila
Butanoato de butila	Ácido nonanóico (ou ác. caprílico)	Butanoato de hexila	Cânfora
Butanoato de hexila	Ácido dodecanóico (ou ác. caprílico)	Butanoato de metila	Hexanal
Butanoato de metila	Ácido 3-fenil -2- ácido propenóico (ou ác. cinâmico)	Butanoato de propila	(Z)- hexen-3-ol
Butanoato de etila	Ácido heptanóico	α -Farnesene	Hexanol
Butanoato de pentila	Ácido isopropilacético (ou ac. isovalérico)	Hexanal	(E) 3-hexen-1-ol
Butanoato de 1,2-dimetila	Ácido dodecanóico (ou ac. láurico)	Hexanoato de butila	Hexanoato de etila
Butanoato de 2-dimetil butila	Ácido nonanóico	Hexanoato de etila	2-metil propanol
Butanoato de 2-metil hexila	Acetato de 2-fenil etila	Hexanoato de isopentila	Octanol
Butanoato de 2-metil butila	Álcool de 2-fenil etila	Hexanoato de hexila	Propionato de butila
1-butanol	Benzotiazol	Hexanoato de propila	
Butanoato de 2-metil butila	2-(2-Butoxietoxi)etanol	Hexanoato de metila	
Decanal	Dodecano	2-metil butanoato de etila	
Etanol	3,7-dimetil -octa- 1,6- dien- 3- ol (ou Linalol)	2-metil butanoato de metila	
2-furancarboxaldeído	(E)-Epoxi linalol	2-metil butanoato de propila	
1-hexanol	2-Etil hexanol	2-metil butanoato de butila	
Heptanal	Etanol	2-metil butanoato de pentila	
Hexanal	3-fenil propenal (ou (E)-cinamalaldeído)	2-metil butanoato de hexila	
Hexanoato de butila	Heptano	Propionato de hexila	
Hexanoato de etila	Hexadecano	Propionato de propila	
Hexanoato de propila	Hexanal	Propionato de butila	
Hexanoato de hexila	Hexanol	Octanoato de isopentila	
1-metoxi-4(2-propenil)benzeno	(Z)-3-Hexen-1-ol	Pentanoato de etila	
2-metil-1-butanol	3- Metilbutanol		
2-metil-1-propanol	Metanol		
2-metilbutil acetato	(E)-cinamato de metila		
2-metilpropil acetato	2-Nonanol		
6-metil-5-heptano-2-ona	2-Octan-1-ol		
Nonanal	7-Octan-4-ol		
Octanoato de etila	Octanoato de metila		
Octanal	3-Penten-2-one		
1-pentanol	Pentadecano		
Pentanal	Tetradecano		
Pentanoato de etila	Tolueno		
Propanoato de butila			
Propanoato de hexila			
Propanoato de propila			
1-propanol			
2-propanol			

Fonte: MATTHEIS ; BUCHANAN ; FELLMAN (1998); GUEDES *et al.* (2004); JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, (2003) e MEHINAGIC *et al.* (2006).

1.2 Sidra

Sidra, bebida frizante obtida da fermentação alcoólica do mosto de maçãs, consiste em um dos principais produtos da indústria de processamento da maçã em países da Europa como a França, país que recebe o título de melhor produtor mundial. A diferença mais expressiva do produto francês está na valorização da fermentação oxidativa (devido à grande contribuição desta etapa em termos de compostos aromáticos gerados). Esta etapa é realizada mediante a aplicação

de temperaturas menores durante o processo (reduzindo a velocidade de fermentação) e na qualidade tecnológica das frutas utilizadas (NOGUEIRA *et al.*, 2008; NOGUEIRA; LEQUÉRÉ; BULDIN, 2003).

Segundo legislação brasileira, “Sidra é a bebida com graduação alcoólica de 4 a 8% v/v, a 20 °C, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã, podendo ser adicionada de suco de pera, em proporção máxima de 30%, sacarose não superior aos açúcares da fruta e água potável” (BRASIL, 2009).

No produto brasileiro existem inúmeras etapas durante o processo de fabricação que diferem do produto francês, primeiramente as frutas utilizadas são consideradas de descarte, ou seja, não apresentam aspectos desejáveis para o consumo *in natura*, e ocorre o procedimento de sulfitagem do mosto eliminando assim as leveduras oxidativas ou não-*Saccharomyces* que são conhecidas pela contribuição aos compostos voláteis aromáticos. No Brasil o produto é suave, pouco aromático e com baixa acidez, faltando uma padronização da bebida (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Já as sidras francesas são caracterizadas pelo sabor suave, adstringente (tanínicos) e aromas frutados (MANGAS *et al.*, 1998; LEA, 2004; LEA; DRILLEAU, 2003; NOGUEIRA; LEQUÉRÉ; BULDIN, 2003).

O processo de obtenção da sidra se inicia com a seleção da fruta para eliminação das que se encontram contaminadas ou deterioradas, lavagem com água por aspensão ou imersão e posteriormente a trituração. Após a trituração é realizada a extração do suco através da prensagem, e o suco obtido é beneficiado pela adição de enzimas pectinolíticas nas proporções indicadas pelos fabricantes. Logo ocorre a primeira sulfitagem pela adição de 30 – 50 mg/L de anidrido sulfuroso. Após a despectinização e precipitação, em cerca de 24 horas, o mosto é trasfegado e a borra encaminhada para nova prensagem (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

No Brasil, existe a prática de, após a clarificação, adicionar até 80% de água, com o uso de uma solução contendo açúcar líquido, ativadores de fermentação, como sais de amônio, vitaminas, ergosterol, ácidos graxos insaturados e ácido cítrico. Esta adição tem como principal objetivo aumentar o rendimento de sidra. Esta prática é permitida pela legislação brasileira (BRASIL, 2009), mas acaba por descaracterizar e prejudicar a qualidade do produto final.

Em seguida ocorre a fermentação, que pode ser com a ação das leveduras existentes naturalmente nas frutas ou através da adição de inóculo com levedura seca ativa, na proporção que corresponda a uma população inicial de $2,0 \times 10^6$ ufc/mL. Quando ocorre totalmente a

conversão de açúcares a dióxido de carbono e etanol, finaliza-se a fermentação e o fermentado é filtrado e transferido para outros tanques onde permanecerão durante a maturação (aproximadamente 30 dias). Ao final da maturação, adiciona-se sacarose em proporções de 75 – 100 g/L e se necessário corrige-se a acidez com ácido láctico. Para a conservação do produto utiliza-se metabissulfito de potássio, em uma proporção que corresponda a 20 – 80 mg/L de SO₂ livre e o sorbato de potássio (WOSIACKI, 2001).

As etapas seguintes são clarificação com gelatina e bentonita, estabilização por tratamento térmico, adição de CO₂ no produto a baixa temperatura, engarramento em garrafas de vidro, colocação da rolha e rotulagem (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

1.3 Compostos aromáticos em sidras

Com relação aos metabólitos secundários de fermentação, normalmente é descrito que os ésteres são os melhores contribuintes para características de odor frutado no *bouquet* do vinho e podem ser formados em concentrações relativamente altas por leveduras oxidativas (ROJAS *et al.*, 2003; VIANA *et al.*, 2008).

Apesar de a fermentação com culturas puras de *S. cerevisiae* prover vantagens de facilidade de controle e fermentações homogêneas, a produção de vinhos com estas monoculturas puras resultam em falta de complexidade nos aromas e de novidade no produto final, o aroma acaba sendo descrito como neutro ou pouco típico. A inclusão de leveduras oxidativas como parte de culturas mistas juntamente com *S. cerevisiae* tem sido sugerida como uma maneira de se aproveitar uma fermentação espontânea e melhorar as características de *flavour* ao produto final (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000; ROMANO *et al.*, 2003; JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2003; ROJAS *et al.*, 2003; CIANI; BECO; COMITINI, 2006; XU; ZHAO; WANG, 2006).

Outra forma de valorizar a formação de compostos aromáticos como ésteres e álcoois superiores é a adição de precursores destes compostos. Tem-se estudado o efeito dos aminoácidos e outros compostos nitrogenados na formação de voláteis (GAMERO *et al.*, 2011; HERNENDEZ-ORTE *et al.*, 2012).

Os compostos voláteis contribuintes para o aroma que são mais encontrados em fermentado de maçã e sidra são álcoois isoamílicos, 2-fenil-etanol, álcool isobutílico, etanoato de etila, etanoato de 2-fenil-etila, etanoato de hexila, etanoato de isopentila, butanoato de etila,

lactato de etila, octanoato de etila, succinato de dietila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, ácido butanóico, ácido octanóico, ácido 2-metil butanóico, 2-metil-butanoato de etila, (XU; FAN; QIAN, 2007; MADRERA *et al.*, 2008; XU; ZHAO; WANG, 2006; JANZANTTI; FRANCO; WOSIACKI, 2003).

1.4 Influência dos aminoácidos nos compostos aromáticos

O suco de maçã contém todos os nutrientes necessários para o crescimento das leveduras, sendo que a principal fonte de carbono e energia para este fim é proveniente de açúcares solúveis. Entretanto, como o nitrogênio é um nutriente limitante para o crescimento das leveduras, quando existe a deficiência deste composto ocorrem fermentações interrompidas e/ou lentas (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012; CRUZ; CILLI; ERNANDES, 2002; DRILLEAU, 1990). Na fermentação alcoólica, o conteúdo de nitrogênio disponível para a levedura é utilizado em 80% de seu total durante a fase estacionária, com o intuito de estimular a produção de proteínas, que são importantes no transporte de açúcares (BELY; SALMON; BARRE, 1994).

A porção de nitrogênio do suco de maçã é representada de 86 a 95% pelos aminoácidos asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutâmico e serina, e estes são rapidamente metabolizados pelas leveduras (LEQUERE; DRILLEAU, 1998). O teor de nitrogênio total nas frutas pode variar de menos de 75mg/L (baixos teores) até maior que 150 mg/L (alto teor), essas variações ocorrem principalmente devido ao grau da maturidade da fruta e da quantidade de fertilizantes utilizadas (NOGUEIRA; LEQUÉRÉ; BULDIN, 2003).

Os aminoácidos livres e a amônia contribuem com a maioria do nitrogênio de importância para a fermentação alcoólica. Concentrações de aminoácidos livres e seus perfis na maçã variam dependendo da cultivar, da quantidade de fertilizantes, da localização da fruta na árvore, do grau de maturidade, da época da colheita e da idade do pomar (YE; YUE; YUAN, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2003).

A composição do suco e a cepa de levedura utilizadas podem afetar a assimilação dos compostos nitrogenados (COLOMBIÉ; LATRILLE; SABLAYROLLES, 2007; JULIEN *et al.*, 2000; MANGINOT; ROUSTAN; SABLAYROLLES, 1998), assim como o metabolismo dos aminoácidos, a velocidade de fermentação, a cinética de produção de aromas e, conseqüentemente interferindo na qualidade do produto final (SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998; GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008; GOÑI; AZPILICUETA,

1999; INGLEDEW; KUNKEE, 1985; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012; OUGH; HUANG; STEVENS, 1991; PÉREZ-ZÚÑIGA; ABAD; CARTAGENA, 1997).

Durante a fermentação alcoólica as leveduras sintetizam um grande número de compostos aromáticos, sendo a maior parte álcoois superiores, ácidos graxos e ésteres. Estes compostos são normalmente formados a partir de aminoácidos, quando estes se encontram em altos teores no mosto ou utilizando a quebra de açúcares (WALKER, 1998). Riberau – Gayon *et al.* (1975) reportaram que 10% do total de álcoois superiores são sintetizados a partir de aminoácidos correspondentes, 65% de outros aminoácidos e 25% de açúcares.

A concentração de aminoácidos no mosto pode influenciar o *bouquet* do fermentado de uma forma decisiva, já que estes compostos são essenciais para o metabolismo das leveduras na produção de sidra, afetando diretamente a cinética de fermentação e participando do desenvolvimento de aromas na bebida final (KUNKEE, 1991; ANCIN-AZPILICUETA; TORREA GÕNI).

O catabolismo dos aminoácidos para se obter seus ceto-ácidos e álcoois correspondentes são um exemplo da importante relação entre o metabolismo do nitrogênio e seus grupos de compostos voláteis. Estudos têm sido realizados com relação ao efeito da adição de amônia sobre os compostos voláteis, mas poucos estudos focam diretamente no impacto da adição de aminoácidos sobre os voláteis da fermentação (GARDEN-CERDAN; ANCIN-AZPILICUETA, 2008).

Vários compostos voláteis, de diferentes classes, têm sido identificados em sidras, sendo que a maioria correspondem a ésteres e álcoois superiores. Alguns destes compostos são derivados da própria fruta e outros típicos de cada cultivar, mas, a maioria é formado na fermentação alcoólica como metabólitos secundários (XU; FAN; QIAN, 2007; PENG; YUE; YUAN, 2009; RITA *et al.*, 2011; FAN; XU; HAN, 2011; BRAGA *et al.*, 2013; YE; YUE; YUAN, 2014; HAIDER *et al.*, 2014; XU; ZHAO; WANG, 2006; MADRERA; MANGAS 2011).

No caso dos vinhos, a maioria dos compostos são acumulados na uva sob a forma de precursores inodoros, o que implica que a sensação aromática só será efetivamente liberada (percebida) após a transformação da molécula precursora. Algumas leveduras são capazes de liberar as moléculas aromáticas por clivagem das moléculas precursoras, ou muitas vezes são capazes de sintetizar novas moléculas aromáticas, com isso pode-se afirmar que a levedura tem a capacidade de melhorar o aroma dos vinhos (GAMERO *et al.*, 2011).

Beltran *et al.* (2005) estudaram a influência do tempo de mistura da amônia e dos aminoácidos durante fermentação de mosto sintético sobre a formação de compostos voláteis e consumo de compostos nitrogenados. Estes autores observaram que um alto consumo de amônia em algumas fermentações foi correlacionado com uma maior síntese de glicerol, etanoato de etila e etanal, mas uma menor síntese de álcoois superiores. Hernández-Orte *et al.* (2005) estudaram o efeito da adição de aminoácidos (dobrando o nível de aminoácidos no mosto) para mosto de uva Airen, sobre a composição de voláteis de vinho. Suas conclusões foram que a adição de aminoácidos ao mosto reduziu o conteúdo de 2-feniletanol, metionol e álcool isoamílico, e aumentou o conteúdo de ácido propanoico, γ -butirolactona e isobutanol (GARDEN-CERDAN; ANCIN-AZPILICUETA, 2008). Por todas essas razões, sabe-se que existe relação entre a quantidade de nitrogênio do mosto e os voláteis formados, sendo assim necessário compreender mais desta relação.

Sabe-se que uma adição excessiva de fontes inorgânicas de nitrogênio resulta em níveis residuais excessivos deste composto, o que pode ocasionar instabilidade microbiológica (JIRANEK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995).

A via metabólica de Ehrlich (Figura 1.1) está frequentemente envolvida na formação de compostos aromáticos, é uma via predominante no metabolismo secundário das leveduras e se encontra ativa principalmente se os aminoácidos são a única fonte de nitrogênio para as leveduras (HAZELWOOD *et al.* 2008). O aminoácido é transaminado e descarboxilado para o respectivo aldeído correspondente que é então reduzido ao álcool superior. Se existe a atividade da enzima álcool acetil-transferase o álcool pode ser parcialmente trans-esterificado para o éster acetato. Os produtos da via Ehrlich para os precursores leucina, valina e isoleucina são 3-metil butanol (álcool isoamílico), isobutanol e 2-metil butanol (álcool amílico), respectivamente.

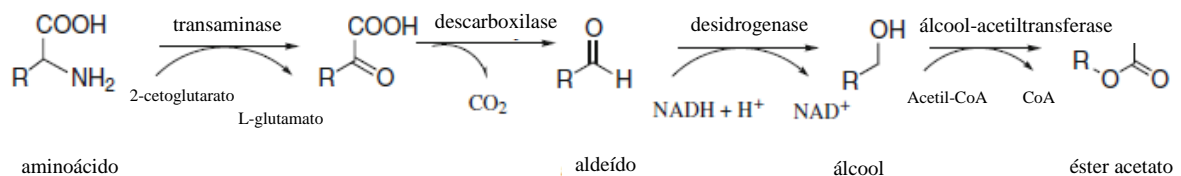


Figura 1.1 Via metabólica de Ehrlich, partindo de um aminoácido para o álcool superior com subsequente esterificação para o acetato.

Fonte: Walker, 1998.

Os ésteres são formados quando um composto de função álcool reage com um composto de função ácida e uma molécula de água é eliminada. Esta reação é reversível, limitada pela reação inversa de hidrólise do éster. Em bebidas fermentadas de frutas existe uma ampla variedade de álcoois e ácidos, com isso o número de ésteres que podem ser formados é muito variável. Nestas bebidas fermentadas a origem dos ésteres pode ser de duas formas distintas: por esterificação enzimática durante o processo de fermentação ou por esterificação química durante o período de envelhecimento da bebida. Em geral, a quantidade de ésteres aumenta durante o período de envelhecimento (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 2006).

As leveduras são capazes de diferenciar fontes boas e ruins de nitrogênio, quando uma fonte boa está presente (amônia, aspartato, asparagina, glutamato), as fontes ruins acabam sendo reprimidas (prolina) (PRETORIUS, 2000).

Os compostos voláteis produzidos pelas leveduras durante a fermentação são variados (Figura 1.2). A concentração dos ésteres depende do cultivar da maçã, do grau de maturidade da fruta, da cepa de levedura inoculada, da temperatura de fermentação, dos métodos de processamento, do pH do mosto, da quantidade de SO₂ adicionado, dos aminoácidos presentes e da fermentação malolática (PRETORIUS, 2000).

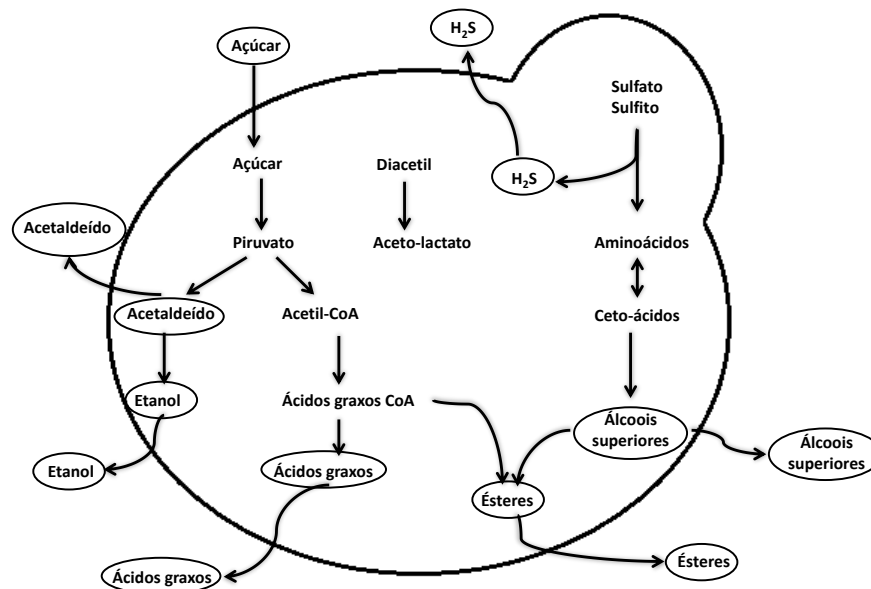


Figura 1.2 Uma representação esquemática do metabolismo dos compostos voláteis pelas leveduras.

FONTE: Adaptado de Henschke e Jiranek, 1993.

A característica de aroma frutado deve-se principalmente devido aos compostos etanoato de hexila, hexanoato de etila, octanoato de etila (aroma de maçã), etanoato de isopentila (aroma de banana) e etanoato de 2-feniletila (notas de aroma floral e mel) (STYGER; PRIOR; BAUER, 2011).

CAPÍTULO 2

PERFIL DE AMINOÁCIDOS DA MAÇÃ E CEPAS DE LEVEDURAS NA FORMAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ÉSTERES NA PRODUÇÃO DA SIDRA

O conteúdo desse capítulo faz parte do artigo publicado na revista “*Journal of Food Science*” (Anexo I).

PERFIL DE AMINOÁCIDOS DA MAÇÃ E CEPAS DE LEVEDURAS NA FORMAÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES E ÉSTERES NA PRODUÇÃO DA SIDRA

RESUMO

O perfil de aminoácidos em maçãs de mesa e seu efeito sobre a síntese de álcoois superiores e ésteres foi estabelecido por análises instrumentais. Os dados foram analisados usando “Análise de Componentes Principais (ACP)” e “Análise Hierárquica de Grupos (AHG)”. O perfil de aminoácidos foi verificado em nove diferentes mostos de maçã. Dois mostos de maçã com alto (> 150 mg/L) e baixo (< 75 mg/L) teor de aminoácidos, e quatro cepas de leveduras com capacidade de fermentação foram usadas para fermentação da sidra. Os aminoácidos aspartato, asparagina e glutamato foram majoritários em todos os sucos analisados, representando de 57,10 a 81,95% do total. Estes três aminoácidos tiveram um alto consumo (> 90%) durante a fermentação de todas as sidras. A ACP explicou 81,42% da variabilidade dos dados e foi verificada uma separação em três grupos de amostras. As sidras produzidas com baixo conteúdo de nitrogênio mostraram uma fermentação lenta e com uma produção 50% a menos de composto voláteis (independente da cepa de levedura utilizada), que foram principalmente 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) e ésteres. Entretanto, na presença de teores mais elevados de aminoácidos (asparagina, aspartato, glutamato e alanina) houve uma clara diferença entre as cepas na produção de álcoois superiores e ésteres etílicos. Compostos como 3-metil-1-butanol, 2-feniletanol, 2-hexanol, etanoato de etila, etanoato de 3-metilbutila, octanoato de etila, butanoato de etila, decanoato de etila e etanoato de hexila, podem ser considerados como parte da estrutura de aroma da própria fruta para as sidras produzidas a partir de maçãs de mesa. Altos conteúdos de aspartato, asparagina, glutamato e alanina são essenciais para a produção de álcoois superiores e ésteres para as leveduras aromáticas durante a fermentação da sidra.

Palavras-chave: mosto de maçã, bio-aromas, quimiometria, compostos nitrogenados.

1 INTRODUÇÃO

Sidra (teor alcoólico de 2,0 a 7,0 °GL, gaseificada) e vinho de maçã (7,1 a 12 °GL) são bebidas obtidas pela total ou parcial fermentação alcoólica de mostos de misturas de maçãs de

mesa ou industriais. A matéria prima e a tecnologia de processamento podem variar dentro dos mais de 20 países produtores da sidra (LEA; DRILLEAU, 2003; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Entretanto, tanto com relação à matéria prima ou tecnologia usada, o aroma frutado é a principal qualidade sensorial da bebida (XU; ZHAO; WANG, 2006; RITA *et al.*, 2011; PIETROWSKI *et al.*, 2012).

Vários compostos voláteis de diferentes classes têm sido encontrados na sidra, principalmente álcoois superiores, ésteres e ácidos graxos (XU; FAN; QIAN, 2007; PENG; YUE; YUAN, 2009; RITA *et al.*, 2011; FAN; XU; HAN, 2011; BRAGA *et al.*, 2013; YE; YUE; YUAN, 2014; HAIDER *et al.*, 2014). Alguns destes são derivados da fruta e típicos do cultivar (butanoato de etila e etanoato de hexila) porém, a maioria são formados durante a fermentação alcoólica como metabólitos secundários (XU; ZHAO; WANG, 2006; MADRERA; MANGAS, 2011).

Os voláteis álcoois isoamílicos, 3-metil-1-butanol (< 200 mg/L), 2-feniletanol, etanoato de etila, etanoato de 2-feniletila, hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, butanoato de 2-metil etila, butanoato de etila, ácido butanoico, ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido 2-metil butanoico, acetato de 2-feniletila, 4-etil guaiacol e 4-etil fenol são os principais responsáveis pelo aroma frutado na sidra (XU; FAN; QIAN, 2007; SAERENS *et al.*, 2008; PENG; YUE; YUAN, 2009; ANTÓN *et al.*, 2014).

A produção de aromas na sidra pode ser influenciada por vários fatores, pode-se citar o ambiente, o cultivar da maçã, a maturidade da fruta, as técnicas de processamento, a cepa de levedura e as condições de fermentação (LEA; DRILLEAU, 2003; BRAGA *et al.*, 2013; HAIDER *et al.*, 2014). Entretanto, o tipo de levedura utilizada e a presença e concentração de intermediários e precursores de voláteis no mosto de maçã, são os principais fatores que podem influenciar na produção de compostos voláteis que contribuem com o aroma (SWIEGERS *et al.*, 2006). Existem poucos estudos que identificam e avaliam a concentração de compostos intermediários na produção de compostos aromáticos na sidra.

A produção de compostos voláteis pode variar de acordo com a cepa de *Saccharomyces* selecionada para a produção da sidra (SUAREZ VALLES *et al.*, 2007). Em países Europeus (Inglaterra, Irlanda, França e Espanha), a produção de sidra segue métodos tradicionais, com fermentação oxidativa (leveduras não-*Saccharomyces*), fermentação alcoólica e transformação malolática pelos micro-organismos nativos das frutas (SUAREZ VALLES *et al.*, 2007;

PIETROWSKI *et al.*, 2012). Em países onde a produção da sidra começou recentemente, e onde a bebida é feita a partir de frutas de mesa colhidas e processadas a 20 °C (países do hemisfério sul), é comum o uso de leveduras comerciais com aptidão aromática.

Os aminoácidos encontrados no mosto inicial de maçãs são os principais precursores e intermediários na biossíntese dos principais compostos voláteis (ARDÖ, 2006). Álcoois superiores são os compostos majoritários em bebidas fermentadas. Eles são formados pelo catabolismo dos aminoácidos na via metabólica de Erlich. Estes álcoois podem ser os intermediários na formação dos ésteres através do processo de esterificação durante a fermentação alcoólica (YE; YUE; YUAN, 2014). Quando desaminados, o principal produto da quebra destes aminoácidos são os álcoois superiores, e este se torna o mediador do processo de esterificação durante a fermentação (GARDEN-CERDAN; ANCIN-AZPILICUETA, 2008).

O conteúdo de nitrogênio inicial em maçãs (27 – 574 mg/L) é diretamente relacionado com o conteúdo de aminoácido, especialmente aspartato, glutamato, asparagina, serina e prolina, que juntos representam 86 – 95% e são os mais facilmente assimiláveis pelas leveduras (LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998). O nitrogênio é considerado um fator limitante de crescimento para a levedura *Saccharomyces*. O nitrogênio assimilável afeta a velocidade de fermentação, e uma concentração superior a 75 mg/L pode prevenir fermentações lentas ou interrompidas (ALBERTI *et al.*, 2011). Estes compostos quando presentes no mosto de maçã podem ser usados na biossíntese de proteínas, metabolizados em outros compostos e usados para outros processos metabólicos que influenciam o crescimento e o metabolismo das leveduras, dado que o nitrogênio constitui 10% de sua matéria seca (ARIAS-GIL; GARDE-CERDAN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2007). A identificação das leveduras com aptidão para a produção de aromas e os aminoácidos usados como precursores, torna possível a padronização da qualidade aromática das sidras através de correções nos mostos iniciais de maçãs.

Consequentemente, o objetivo deste capítulo foi avaliar a variabilidade dos aminoácidos em mostos de maçã, e identificar quais destes aminoácidos estão diretamente relacionados com a produção de compostos do aroma de sidras.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 *Materiais*

O perfil de aminoácidos foi determinado em nove variedades de maçãs de mesa (Gala, Fuji, Granny Smith, Red Delicious, Eva, Carícia, Royal Gala e Lisgala), as quais foram doadas pela Empresa Estação Experimental de Extensão Agricultura e Rural (EPAGRI – SC / Brasil) e pela Agrícola Agrícola (PR / Brasil).

As variedades Gala e Royal Gala, com índice de maturação de 3,0 – 3,5 (teste de índice de iodo) (Llorente *et al.*, 2012), foram usadas como mostos de maçãs para fermentação. Foram avaliadas três cepas de leveduras comerciais enológicas *Saccharomyces cerevisiae*: Arôme Plus (Fermol Arôme Plus, ref. PB 2010, AEB Group, Bréscia, Itália); Bouquet (Fermol Bouquet, ref. PB 2004, AEB Group, Bréscia, Itália) e Aromatic (Fermol Aromatic, ref. PB 2540, AEB Group, Bréscia, Itália). A cepa UFLA CA-11 (LNF Latino América, RS, Brasil), comumente usada para a produção de bebidas destiladas, também foi avaliada neste trabalho.

Etanal, propanoato de etila, butanoato de etil 3-metila, etanoato de propila, etanoato de 2-metil propila, butanoato de etila, hexanona, 2-heptanona, 2-metil-1-butanol, 2-hexanol, 2-octanona e hexanoato de etila foram adquiridos pela Interchim (Montluçon, França). Etanoato de etila, etanoato de butila, etanoato de 3-metilbutila, etanoato de hexila, propoanoato de 2-hidroxi etila, 1-hexanol, octanoato de etila, decanoato de etila, ácido butanoico, butanedioato de dietila, 2-feniletanol, dodecanoato de etila e ácido octanóico foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). 3-metil-1-butanol foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes químicos usados neste estudo foram de grau analítico. As soluções aquosas foram preparadas usando água ultra-pura (Millipore, São Paulo, Brasil).

2.2 *Processamento do mosto de maçã*

As maçãs foram selecionadas, lavadas e prensadas em microprocessador (Metvisa CPU, tipo MPA, SC, Brasil) (GOMES *et al.*, 2014). A massa moída foi acondicionada em pacotes plásticos porosos, que foram superpostos e pressionados a de 3,0 kgf/cm² em prensa hidráulica (Eureka, Hoppe Ind. Ltda, RS, Brasil) por 5 minutos. O mosto de maçã foi despectinizado (Pectinex Ultra SP, Novozymes, PR, Brasil) com um conteúdo de enzima de 3,0 mL/hL (120 minutos a 20 – 25 °C); depois da sedimentação, o sobrenadante foi trasfegado, filtrado em papel

filtro qualitativo, armazenado em garrafas de vidro de 600 mL, lacrados com tampa metálica e pasteurizados a 80 – 85 °C por 20 minutos (PIETROWSKI *et al.*, 2012).

2.3 *Processamento da sidra*

O mosto de maçã despectinizado (cultivares Gala e Royal Gala, escolhida devido ao teor de nitrogênio total do mosto de maçã) foi colocado em fermentadores de vidro de 1200 mL (previamente esterilizados em autoclave a 121 °C / 15 min). As quatro cepas na forma seca ativa foram reidratadas de acordo com a instrução do fabricante e inoculadas, com uma população inicial ao redor de $3,0 - 5,0 \times 10^6$ ufc/mL. A fermentação alcoólica foi realizada por 10 dias em anaerobiose a 20 ± 1 °C (tempo necessário para manter a média de 10 g/L açúcares residuais). O dióxido de carbono liberado causa uma redução da massa dos fermentadores e isto torna possível calcular os parâmetros de cinética como tempo de fermentação (até peso constante) e velocidade de fermentação (dCO_2/dt) (BELY; SABLAYROLLES; BARRE, 1990; ALBERTI *et al.*, 2011). A fermentação foi interrompida por centrifugação a 10200 g a 5 °C (Centrífuga Hitachi Himac CR21GII, Tokyo, Japão) por 20 minutos e depois trasfegado, engarrafado e congelado a -18 °C até análises posteriores.

2.4 *Análise cromatográfica dos aminoácidos*

Os aminoácidos foram extraídos a partir de 3 mL de amostras e 2 mL de norleucina 0,25 mmol/L (usada como padrão interno para taxas de recuperação). A mistura foi centrifugada a 13000 g, 4 °C por 20 minutos (Centrífuga Hitachi Himac CR 21 GII, Japão) e o sobrenadante foi filtrado em seringa de nylon de 0,2 µm (Waters, EUA). Os aminoácidos foram derivatizados usando um Kit de reagente AccQ Tag™ da Waters (frasco 1: 200 mmol/L de tampão borato, pH 8,8; frasco 2: carbamato de 6-aminoquinolil-N-hydroxysuccinimidil, AQC; frasco 2B: acetonitrila). A identificação e quantificação foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando um equipamento Alliance 2695 (Waters, MA, EUA) equipado com detector de fluorescência Alliance 2475 (Waters, USA) e uma coluna Pico Tag (4 µm, 3.9 x 150 mm).

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia AccQ Tag™ usando um Kit completo da Warters (USA). Um sistema de eluição binário foi usado, que consistiu de Fase Móvel A (140 mmol/L de acetato de sódio e 17 mmol/L de trietanolamina) e Fase Móvel B

(Acetonitrila 60%). O gradiente usado foi 0% B (0 min), 2% B (0.5 min), 7% B (15 min), 9% B (19 min), 12% B (22 min) e 30% B (33 min) seguido pela lavagem e acondicionamento da coluna. No detector de fluorescência foram usados comprimentos de onda para excitação no valor de 250 nm e para emissão no valor de 395 nm. Os picos foram identificados por comparação do tempo de retenção com os cromatogramas dos padrões de aminoácidos, e a quantificação dos aminoácidos individuais foi feita baseada em área do pico das curvas de calibração destes padrões (em pelo menos cinco concentrações).

2.5 Análise cromatográfica dos compostos voláteis

Amostras (6 mL) de suco de maçã ou sidra foram colocadas em frascos de vidro de 20 mL. Após, foi adicionado 50 µL de padrão interno (ácido heptanóico). Antes da injeção, as amostras foram mantidas a 60 °C por 10 minutos sob agitação no forno do injetor automático (Cromatógrafo a Gás Young Lin Instrument, Anyang, Korea). A captura dos compostos foi feita por *headspace* direto, de acordo com o método descrito por Pietrowski *et al.* (2012). A análise de compostos aromáticos foi feita por cromatografia a gás, usando o equipamento Young Lin Instrument – (YL 6100 GC, Anyang, Korea) equipado com FID, coluna capilar (30 m x 25 mm, 0,25µm de espessura e filme ZB-WAX; Phenomenex, CA, EUA) e detector por ionização de chama. A temperatura de injeção foi 220 °C e a temperatura de detecção foi de 230 °C. O gás de arraste foi nitrogênio, com um fluxo de 2,5 mL/min, e a técnica de injeção foi Split 1:1,2. As condições de análise foram programadas com uma temperatura inicial de 40 °C por 5 minutos, com um aumento de 10 °C/min até 150 °C, mantendo esta temperatura por 10 minutos. A temperatura foi então aumentada por 10 °C/min até 200 °C por 5 minutos e finalmente aumentou em 10 °C/min até 220 °C, onde foi mantida por 16 minutos. O método de injeção automática do CG foi usado com um volume de 1500 µL (CORDENTE *et al.*, 2012). A quantificação foi realizada por curva de calibração de padrões, e as determinações foram feitas em triplicatas.

2.6 Análises físico-químicas

As amostras de suco de maçã e sidra foram analisadas com relação ao teor de açúcares redutores totais (ART) em triplicata usando o método tradicional de Somogyi-Nelson (TANNER; BRUNNER, 1985). O ácido málico foi determinado por titulação (expresso em g/L), a acidez volátil foi expressa como ácido acético (g/L) (IAL, 2008), e nitrogênio total foi determinado pelo

método de Kjeldhal (mg/L) (BARON; BOHUON; DRILLEAU, 1977). O teor de álcool foi analisado por ebulliometria.

2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm DP ou PSD, quando apropriado. A normalidade da distribuição dos dados foi verificada usando o teste Kolmogorov-Smirnov e a variância foi analisada fazendo-se teste *F* (dois grupos) ou teste de Levene (três ou mais grupos). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelas médias do teste *t-Student* para amostras independentes (dois grupos) ou *one-factor* ANOVA seguido do teste LSD Fisher. P-valores abaixo de 0,05 foram usados para confirmar a hipótese de similaridade / igualdade. Uma análise multivariada composta de análise hierárquica de grupos (AHG) foi aplicada para analisar os resultados experimentais e tentar associar os aminoácidos com os compostos voláteis. Para esta proposta, as variáveis foram autoescaladas usando o método *z-score*, onde cada elemento da matriz de dados foi centrado na média e escalados para uma variância um (BRAGA *et al.*, 2013). Uma matriz de dados composta por amostras ($n = 8$) e variáveis ($n = 34$) foi usada, totalizando 272 pontos de dados. AHG foi baseada no método de Ward e a escala métrica euclidiana foi usada para formar os grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando software Statistica 7.0 (Statsoft Inc.).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Poucas informações estão disponíveis com relação à variabilidade de aminoácidos em mosto de maçãs de mesa (ALBERTI *et al.*, 2011). Dezesete aminoácidos foram identificados e a variação de teor foi entre 192,38 e 430,60 mg/L, com uma média de $341,37 \pm 73$ mg/L (Tabela 2.1). Diferenças significativas foram observadas entre os aminoácidos de cada cultivar ($p < 0,05$). Os aminoácidos aspartato, asparagina e glutamato foram os majoritários em todos os sucos de maçãs, representando de 57,10 a 81,96% do total. Resultados similares foram encontrados por Ye, Yue e Yuan (2014) e Garai-Ibabe *et al.* (2013). Lequéré e Drilleau (1998) verificaram resultados similares em variedades industriais de maçãs, mas com conteúdos maiores de serina. Suárez Valles *et al.* (2005) encontraram como aminoácidos predominantes no suco de maçã o aspartato e asparagina.

Tabela 2.1 Média de conteúdo dos valores de aminoácidos em mostos de maçã de diferentes cultivares de mesa.

Aminoácidos	Variedades de mostos de maçã									Média	DP
	Gala *	Gala **	Fuji	Granny smith	Red delicious	Eva	Carícia	Royal Gala	Lisgala		
Aspartato	249,00 ^a	150,00 ^c	168,00 ^{bc}	173,00 ^b	173,00 ^{bc}	77,30 ^d	80,40 ^d	49,70 ^e	141,00 ^{bc}	140,00	62,00
Serina	9,40 ^e	6,16 ^h	7,93 ^f	10,30 ^d	7,69 ^g	21,60 ^b	22,70 ^a	5,56 ⁱ	12,60 ^c	11,50	6,37
Asparagina	22,40 ^g	69,30 ^d	103,00 ^b	149,00 ^a	98,50 ^c	62,60 ^e	66,10 ^d	9,82 ^h	32,90 ^f	68,20	43,90
Glutamato	45,30 ^d	51,70 ^{cd}	32,60 ^e	25,80 ^{ef}	24,00 ^f	52,50 ^c	64,50 ^b	50,40 ^{cd}	105,00 ^a	50,20	24,50
Glicina	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8,18 ^a	7,31 ^b	nd	1,72	3,42
Histidina	nd	8,93 ^b	4,22 ^c	4,51 ^c	4,07 ^c	nd	nd	nd	12,30 ^a	3,78	4,43
NH ₃	2,11 ^c	1,26 ^{de}	0,75 ^f	3,56 ^b	1,26 ^d	1,08 ^e	4,22 ^a	0,67 ^f	1,14 ^{de}	1,78	1,27
Arginina	11,90 ^c	7,96 ^d	6,26 ^f	7,07 ^e	7,12 ^e	nd	23,50 ^a	17,60 ^b	nd	9,05	7,66
Treonina	13,70 ^d	10,30 ^e	10,10 ^e	9,92 ^e	8,68 ^f	14,80 ^c	15,80 ^b	13,70 ^d	20,20 ^a	13,00	3,67
Alanina	19,50 ^b	12,50 ^d	11,70 ^d	15,20 ^c	13,10 ^d	19,50 ^b	16,20 ^c	15,60 ^c	21,90 ^a	16,10	3,52
Cisteína	nd	4,40 ^b	4,85 ^a	4,07 ^b	4,28 ^b	nd	nd	nd	nd	1,96	2,33
Valina	nd	2,97 ^b	nd	3,04 ^a	3,08 ^a	nd	nd	nd	nd	1,01	1,52
Metionina	10,80 ^a	9,75 ^b	8,71 ^e	9,16 ^{cd}	5,90 ^g	8,35 ^f	9,19 ^c	8,99 ^d	10,70 ^a	9,06	1,44
Lisina	6,80 ^b	5,78 ^f	6,05 ^e	7,58 ^a	5,21 ^h	6,60 ^c	6,32 ^d	5,45 ^g	6,28 ^d	6,23	0,72
Isoleucina	nd	3,22 ^b	2,65 ^c	3,96 ^a	1,77 ^d	nd	nd	nd	nd	1,29	1,63
Leucina	6,06 ^b	3,17 ^g	3,60 ^f	4,25 ^d	3,86 ^e	nd	nd	5,01 ^c	17,70 ^a	4,85	5,23
Fenilalanina	2,15 ^c	nd	nd	nd	nd	1,72 ^d	3,50 ^a	2,57 ^b	1,68 ^e	1,29	1,33
∑ de aminoácidos	400,00	348,00	371,00	431,00	362,00	266,00	320,00	192,00	384,00	341,00	73,10

Nota: conteúdo de aminoácidos (mg/L); Gala *, **: diferentes produtores; nd = não detectado; resultados são médias de três replicatas. DP = desvio padrão; Diferentes letras na mesma linha representam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$). Prolina não foi determinada devido dificuldades em sua separação durante a fase de extração.

O perfil de aminoácidos parece estar associado com o cultivar (ZHANG; LI; CHENG, 2010), mas isto pode variar de acordo com a idade da planta, fatores climáticos e fertilização feita com nitrogênio (LEA; DRILLEAU, 2003).

As variedades Gala* e Royal Gala com alto (> 150.00 mg/L) e baixo conteúdo de nitrogênio (< 75.00 mg/L) (ALBERTI *et al.*, 2011), respectivamente (Tabela 2.2), foram utilizadas para avaliar o efeito da concentração inicial de aminoácidos na formação de compostos voláteis durante a fermentação da sidra.

O conteúdo de acidez classifica os mostos de Gala e Royal Gala como doce ou com baixa acidez (< 4.50 g/L) (Tabela 2.2) (LEA, 2004). O conteúdo de açúcar está em concordância com o estágio de maturação (aceitável para consumo como fruta fresca). O valor da razão entre açúcar/acidez (ART/AT) foi 33,20 (mosto Gala) e 46,15 (mosto Royal Gala), confirmando que as frutas estão aceitáveis para consumo (PAGANINI *et al.*, 2004).

O tempo de fermentação de 12 dias para sidra é suficiente para o consumo total de açúcares pela levedura a uma temperatura superior a 20 °C e conteúdo de nitrogênio ao redor de 75 mg/L (ALBERTI *et al.*, 2011; BRAGA *et al.*, 2013). Entretanto, todos os tratamentos com fermentação alcoólica foram interrompidos antes do completo consumo dos açúcares para evitar alterações no perfil volátil e na liberação de aminoácidos pela autólise das leveduras (ALCAIDE-HIDALGO *et al.*, 2007).

Tabela 2.2 Parâmetros de rotina determinados em mosto de maçã (variedades Gala* e Royal Gala) e sidras produzidas com diferentes cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* (com 10 dias de fermentação).

Análises	Mosto de maçã		Cepas de leveduras e sidras varietais **							
			Bouquet		Arome Plus		Aromatic		UFLA CA – 11	
	GA	RG	GA	RG	GA	RG	GA	RG	GA	RG
Nitrogênio (mg/L)	153,70 ± 0,02	62,48 ± 1,75	65,64 ± 6,54 ^a	24,18 ± 0,00 ^b	63,79 ± 0,01 ^a	27,20 ± 0,00 ^a	64,57 ± 5,34 ^a	28,72 ± 2,14 ^a	62,87 ± 1,30 ^a	24,18 ± 0,00 ^b
AT (g/L)	3,40 ± 0,04	2,72 ± 0,00	3,30 ± 0,01 ^a	3,42 ± 0,01 ^a	3,50 ± 0,01 ^a	3,37 ± 0,00 ^a	3,40 ± 0,01 ^a	3,03 ± 0,00 ^b	2,60 ± 0,01 ^b	3,10 ± 0,00 ^b
AV (g/L)	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,50 ± 0,01 ^a	0,50 ± 0,00	0,30 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,00	0,40 ± 0,01 ^a	0,40 ± 0,00	0,30 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,00
ART (g/L)	112,90 ± 0,09	125,52 ± 0,77	13,80 ± 0,04 ^a	65,17 ± 0,02 ^a	18,90 ± 0,05 ^b	69,47 ± 0,74 ^a	11,00 ± 0,02 ^b	47,79 ± 0,23 ^b	7,90 ± 0,05 ^c	69,49 ± 0,21 ^a
Etanol (% v/v)	nd.	nd.	5,40	3,80	5,10	3,70	5,60	4,20	5,80	3,30

Nota: GA = variedade de maçã Gala; RG = variedade de maçã Royal Gala. Diferentes letras na mesma linha e mesma variedade representam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). AT = acidez total; AV = acidez volátil; ART = açúcares redutores totais; Sidra** após 10 dias de fermentação alcoólica. Resultados são médias de três replicatas; nd = não detectado.

Os resultados mostram a influência do conteúdo inicial de nitrogênio sobre a velocidade de fermentação (Tabela 2.2). Este efeito do nitrogênio inicial sobre a velocidade de fermentação em sidras e vinhos foi estudado anteriormente (JULIEN *et al.*, 2000; BELTRAN *et al.*, 2005; ALBERTI *et al.*, 2011). Isto indica que o conteúdo de álcool no produto final foi, principalmente, devido ao conteúdo de nitrogênio inicial no mosto, que variou de 3,3 a 5,8% (v/v). O conteúdo residual de açúcar para o fermentado feito com a variedade Royal Gala permaneceu alto (ao redor de 50% do total) e o tempo para o consumo total dos açúcares seria possivelmente de 20 dias ou mais. Esta fermentação lenta pode ser explicada pelo conteúdo de nitrogênio consumido, que foi ao redor de 90 a 40 mg/L para a sidra com Gala e Royal Gala, respectivamente.

A variação na acidez total (2,6 a 3,5 g/L) foi devida a produção de ácidos orgânicos pelas leveduras. A acidez volátil aumentou para todas as cepas analisadas nas duas sidras varietais (Tabela 2.2), o que pode ter acontecido devido à síntese de ácido acético e acetato de etila (CSOMA; SIPICZKI, 2008) porque estes valores estão abaixo dos indicados para contaminação por bactérias (1,2 g/L) (CORDENTE *et al.*, 2012).

A média de consumo de aminoácidos foi de 286,55 e 154,90 mg/L, nas sidras produzidas com Gala* e Royal Gala, respectivamente (Tabela 2.3). O consumo de nitrogênio por *S. cerevisiae* no processamento de sidras ocorre dentro de dois ou três dias de fermentação, o que corresponde à fase de crescimento ou fase log das células (ALBERTI *et al.*, 2011).

Tabela 2.3 Média \pm desvio padrão (DP) valores de conteúdo de aminoácidos em sidras (mostos de maçã Gala* e Royal) preparados com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* após 10 dias de fermentação alcoólica.

Aminoácidos	Cepas de leveduras e sidras varietais								Média		DP	
	Bouquet		Arome Plus		Aromatic		UFLA CA-11		GA	RG	GA	RG
	GA	RG	GA	RG	GA	RG	GA	RG				
Aspartato	10,60 ^b	4,89 ^b	10,10 ^b	5,33 ^a	12,00 ^a	4,58 ^c	12,50 ^a	4,56 ^c	11,30	4,84	1,15	0,36
Serina	5,34 ^b	nd	5,36 ^a	nd	5,37 ^a	nd	5,33 ^b	2,66	5,35	2,66	0,02	0,00
Asparagina	0,58 ^c	nd	0,65 ^b	nd	0,73 ^a	nd	0,57 ^c	0,27	0,63	0,27	0,07	0,00
Glutamato	9,88 ^d	6,85	18,30 ^a	nd	16,30 ^c	nd	17,60 ^b	nd	15,50	6,85	3,85	0,00
Glicina	nd	nd	6,01 ^c	nd	7,01 ^a	nd	6,88 ^b	nd	4,98	-	3,35	-
Histidina	nd	nd	10,20 ^c	nd	10,60 ^b	nd	12,20 ^a	nd	8,26	-	5,57	-
NH ₃	0,10 ^c	0,06	nd	nd	0,33 ^b	nd	0,77 ^a	0,06	0,30	0,03	0,34	0,01
Arginina	11,50 ^b	5,82 ^b	12,30 ^a	5,63 ^c	10,50 ^c	5,99 ^a	10,50 ^c	5,07 ^d	11,20	5,16	0,90	1,02
Treonina	nd	nd	nd	nd	7,34 ^a	nd	7,16 ^b	nd	3,62	-	4,19	-
Alanina	6,87 ^b	11,10 ^b	8,43 ^a	13,80 ^a	7,06 ^b	6,72 ^c	6,92 ^b	4,69 ^d	7,32	8,86	0,74	3,81
Cisteína	8,55 ^a	7,92 ^b	nd	6,34 ^c	8,08 ^c	5,94 ^d	8,44 ^b	9,51 ^a	6,27	7,43	4,18	1,63
Valina	nd	nd	5,94 ^b	nd	6,24 ^a	2,83	5,69 ^c	nd	4,47	1,89	2,99	0,00
Metionina	8,75 ^d	nd	8,89 ^a	nd	8,86 ^b	nd	8,81 ^c	nd	8,83	-	0,06	-
Lisina	9,85 ^b	nd	nd	nd	9,81 ^b	5,08 ^a	9,92 ^a	4,95 ^b	7,39	4,17	4,93	1,10
Isoleucina	3,09 ^d	nd	10,90 ^b	nd	8,81 ^c	nd	12,90 ^a	nd	8,92	-	4,24	-
Leucina	6,96 ^d	3,53	8,68 ^b	3,52	8,49 ^c	3,55	10,30 ^a	3,52	8,62	3,53	1,38	0,01
Fenilalanina	nd	2,85 ^a	nd	2,84 ^a	nd	3,05 ^a	nd	1,86 ^c	-	2,65	-	0,54
Σ de aminoácidos	81,90	43,00	105,00	34,70	127,00	35,10	137,00	37,10	113,00	37,50	24,40	3,82

Nota: conteúdo de aminoácidos (mg/L); Gala = variedade de maçã Gala; RG = variedade de maçã Royal Gala; nd = não detectado; resultados são médias de três replicatas. Diferentes letras na mesma linha representam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$).

O conteúdo de aminoácidos nas sidras com a variedade Gala* indicou a presença de aminoácidos assimiláveis após a fermentação (Tabela 2.3). Nestas sidras, foi observado que o consumo de aminoácidos variou de 262,92 a 317,59 mg/L, dependendo da cepa de levedura. Nas sidras com Royal Gala, o conteúdo de aminoácido residual correspondeu aos compostos que não foram assimilados porque as cepas não mostraram diferença significativa no consumo destes compostos.

A falta de nitrogênio no mosto da maçã Royal Gala foi responsável por uma fermentação lenta (Tabela 2.2). Baseado no nível de aminoácido consumido durante a fermentação da sidra (mosto Gala*), e no baixo conteúdo de nitrogênio inicial no mosto Royal Gala, uma correção de 130 a 150 mg/L de nitrogênio total poderia prevenir a fermentação interrompida (Tabela 2.2). Os aminoácidos aspartato, asparagina, glutamato, alanina e arginina corresponderam a 87,23% (348,48 mg/L) do total destes compostos no mosto de maçã Gala, e 74,38% (143,09 mg/L) do total de aminoácidos no mosto Royal Gala. A média de consumo destes aminoácidos na sidra

com mosto Gala foi aspartato (95,49%), asparagina (97,18%), glutamato (65,71%), arginina (6,24%) e alanina (61,55%). Com o mosto de maçã Royal Gala foi aspartato (90,25%), asparagina (99,35%), glutamato (96,60%), arginina (68,10%) e alanina (41,79%). Com isso, uma correção com aspartato, asparagina e glutamato nas proporções de (3,0:0,4:1,8) poderia ser suficiente para evitar fermentação interrompida.

Os aminoácidos histidina, cisteína, valina e isoleucina não foram identificados nos dois mostos de maçã, mas estavam presentes em algumas das sidras. Isto pode indicar que eles podem ser sintetizados ou liberados durante a fermentação pelo metabolismo das leveduras (YE; YUE; YUAN, 2014).

Dezessete compostos voláteis (n = 17) foram identificados e quantificados nas sidras varietais. O total de compostos voláteis foi 860 mg/L e 2178 mg/L para as variedades Gala* e Royal Gala, respectivamente. Estes compostos correspondem a ésteres, aldeídos e álcoois. O principal composto no mosto Gala* foi etanal (53,2%), etanoato de etila (18,53%), 3-metil-1-butanol (10,80%) e dodecanoato de etila (6,14%). No mosto Royal Gala os principais compostos foram etanoato de etila (77,35%), etanal (17,83%) e 1-hexanol (3,75%) (Tabela 2.4). Estes compostos diferiram entre as amostras (p < 0,05) devido a influencia das cepas de leveduras.

O total de voláteis produzidos nas sidras com a variedade Gala variou de 3276,20 a 4929,00 mg/L, para *S. cerevisiae* UFLA CA-11 e Bouquet, respectivamente, indicando o efeito da cepa de levedura sobre a produção de compostos voláteis. Nas sidras preparadas com o cultivar Royal Gala, a concentração de compostos voláteis produzida foi menor, variando de 204,25 a 402,29 mg/L, para *S. cerevisiae* Arome Plus e Bouquet, respectivamente. A cepa UFLA CA-11 obteve uma concentração final de compostos voláteis menor que o mosto original. Esta cepa foi desenvolvida para produzir baixas quantidades de compostos voláteis e é indicada para a produção de bebidas destiladas (ALCARDE; MONTEIRO; BELLUCO, 2012). As sidras preparadas com a cepa UFLA CA-11 mostraram a mesma quantidade de ésteres nas duas amostras (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 Média \pm desvio padrão (DP) valores de conteúdo de compostos voláteis em mostos de maçã (variedades Gala* e Royal Gala) e sidras produzidas com diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* após 10 dias de fermentação alcoólica.

Compostos voláteis	Mosto de maçã		Sidras produzidas com diferentes <i>S. cerevisiae</i>							
			Bouquet		Arome Plus		Aromatic		UFLA CA-11	
	GA	RG	GA	RG	GA	RG	GA	RG	GA	RG
Etanoato de etila	159,00 \pm 2,00	1685,00 \pm 108,00	980,00 \pm 17,00 ^a	352,00 \pm 23,00 ^a	617,00 \pm 20,00 ^b	352,00 \pm 10,00 ^a	623,00 \pm 2,00 ^b	303,00 \pm 2,00 ^{ab}	199,00 \pm 0,60 ^c	272,00 \pm 28,00 ^b
Etanoato de 2-metilpropila	10,60 \pm 1,00	nd	nd	nd	nd	nd	30,20 \pm 0,40 ^a	nd	18,00 \pm 0,40 ^b	nd
Butanoato de etila	nd	nd	20,20 \pm 0,70 ^a	nd	nd	nd	15,10 \pm 0,20 ^b	nd	nd	nd
Etanoato de butila	22,70 \pm 0,20	nd	19,00 \pm 0,07 ^a	nd	13,20 \pm 1,00 ^b	nd	14,20 \pm 0,10 ^b	nd	7,65 \pm 0,03 ^c	nd
Etanoato de 3-metilbutila	27,00 \pm 0,30	nd	110,00 \pm 3,00 ^a	nd	59,00 \pm 3,00 ^c	nd	82,80 \pm 2,00 ^b	nd	31,00 \pm 0,07 ^d	nd
Etanoato de hexila	13,50 \pm 0,30	nd	39,70 \pm 2,00 ^a	13,60 \pm 0,06 ^a	14,60 \pm 0,30 ^c	11,80 \pm 0,60 ^b	25,70 \pm 1,00 ^b	10,70 \pm 0,20 ^c	12,70 \pm 0,07 ^c	9,92 \pm 0,01 ^c
Octanoato de etila	nd	nd	66,6 \pm 2,00 ^a	20,00 \pm 0,40 ^a	23,70 \pm 2,00 ^d	18,50 \pm 0,60 ^b	42,40 \pm 0,30 ^b	18,70 \pm 0,20 ^{ab}	28,50 \pm 0,90 ^c	17,90 \pm 0,70 ^b
Decanoato de etila	nd	nd	41,20 \pm 3,00 ^a	12,10 \pm 0,10 ^a	nd	9,81 \pm 0,20 ^c	11,70 \pm 0,1 ^b	11,40 \pm 0,02 ^b	9,05 \pm 0,10 ^b	9,02 \pm 0,10 ^d
Dodecanoato de etila	52,80 \pm 0,70	23,4 \pm 0,00	51,70 \pm 0,60 ^a	22,60 \pm 1,00 ^c	45,50 \pm 0,30 ^b	nd	40,70 \pm 0,40 ^c	25,80 \pm 0,00 ^b	39,40 \pm 0,20 ^d	35,30 \pm 0,60 ^a
2-heptanona	nd	nd	23,20 \pm 0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-octanona	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21,60 \pm 0,30	nd
2-hexanol	nd	nd	210,00 \pm 4,00 ^a	nd	84,90 \pm 0,50 ^b	nd	213,00 \pm 2,00 ^a	nd	73,10 \pm 6,00 ^c	nd
3-metil-1-butanol	92,90 \pm 2,00	nd	2153,00 \pm 8,00 ^c	179,00 \pm 0,00 ^a	44,00 ^a	124,00 \pm 0,10 ^b	2581,00 \pm 31,00 ^a	127,00 \pm 6,00 ^b	2314,00 \pm 39,00 ^b	93,70 \pm 6,00 ^c
1-hexanol	23,60 \pm 1,00	81,60 \pm 0,00	nd	85,40 \pm 0,00 ^b	6,92 \pm 1,00 ^c	105,00 \pm 5,00 ^a	14,20 \pm 4,00 ^a	88,80 \pm 8,00 ^b	11,30 \pm 7,00 ^b	117,00 \pm 0,00 ^a
2-feniletanol	nd	nd	800,00 \pm 5,00 ^b	nd	694,00 \pm 19,00 ^c	nd	972,00 \pm 1,00 ^a	nd	771,00 \pm 70,00 ^{bc}	nd
Hexanona	nd	nd	nd	30,80 \pm 1,00 ^{ab}	nd	28,70 \pm 0,60 ^b	nd	21,90 \pm 0,20 ^c	nd	32,60 \pm 2,00 ^a
Etanal	458,00 \pm 30,00	388,00 \pm 30,40	1275,00 \pm 12,00 ^a	114,00 ^a	724,00 \pm 13,00 ^c	100,00 ^{ab}	816,00 \pm 4,00 ^b	1922,00 \pm 18,00 ^a	600,00 \pm 1,00 ^d	1569,00 \pm 0,00 ^b
Σ de voláteis	860,00	2178,00	5789,00	2581,00	4773,00	2383,00	5482,00	2530,00	4136,00	2157,00

Nota: concentração de compostos voláteis identificados (mg/L); Gala = variedade de maçã Gala; RG = variedade de maçã Royal Gala; nd = não detectado; resultados são médias de três replicatas. Diferentes letras na mesma linha representam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$).

A levedura *S. cerevisiae* produziu a concentração mais alta de ésteres (1328,49 mg/L) na sidra preparada com o cultivar Gala. Na sidra com Royal Gala a produção foi de apenas 420,54 mg/L (31,60%). Nas sidras produzidas com as cepas Arome Plus e Aromatic a produção de ésteres correspondeu a apenas 50,68% e 41,72% da produção nas amostras com a mesma cepa, mas usando a variedade Gala na preparação do mosto. As sidras preparadas com UFLA CA-11 apresentaram os mesmos valores para os ésteres em ambas as fermentações (Tabela 2.4).

O 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) é um composto comum produzido por leveduras *S. cerevisiae* (GARDEN-CERDAN; ANCIN-AZPILICUETA, 2006) e nas sidras produzidas com a variedade Gala apresentou valores acima de 2152 mg/L. Entretanto, a produção deste composto foi influenciada na sidra produzida com a variedade Royal Gala, e uma média de apenas 131 mg/L foi produzida (Tabela 2.4). De acordo com Fan, Xu e Han (2011), 3-metil-1-butanol é considerado o mais importante composto, quantitativamente, em sidras, e contribui com notas aromáticas de malte no produto final.

O etanoato de 3-metilbutila foi identificado em todas as sidras produzidas com cultivar Gala, mas não foi observado nas sidras preparadas com Royal Gala. Octanoato de etila foi encontrado em todas as sidras, mas com teores mais baixos nas sidras com Royal Gala (Tabela 2.4). De acordo com Cortes e Blanco (2010) estes dois compostos influenciam o vinho com notas de aroma frutado. A maior produtora destes compostos foi a cepa *S. cerevisiae* Bouquet.

Analisando o perfil de voláteis das sidras feitas em diferentes países (China, estados Unidos e Espanha) na literatura percebe-se que existe uma similaridade nos compostos aromáticos. Os compostos identificados neste estudo, e também nas sidras internacionais, foram butanoato de etila, etanoato de 3-metilbutila, 3-metil-1-butanol, etanoato de hexila, 2-octanona, propanoato de 2-hidroxi etila, 1-hexanol, octanoato de etila, decanoato de etila, 2-feniletanol e dodecanoato de etila (XU; ZHAO; WANG, 2006; YULIANTI; REITMEIER; BOYLSTON, 2004; FAN; XU; HAN, 2011; MADRERA; LOBO; ALONSO, 2010; MADRERA *et al.*, 2005).

A produção de compostos voláteis e o consumo de aminoácidos das diferentes sidras foram analisados usando análise de componentes principais (ACP) com o objetivo de verificar as diferenças entre as cepas e cultivares com relação a produção de compostos, com uma variação no perfil inicial de aminoácidos. A Figura 2.1 mostra um gráfico (PC1 X PC2) para todas as variáveis (34 fatores). Os resultados foram autoescalados antes de serem submetido à ACP. PC 1

explicou 60,55% da variância total dos dados, enquanto a PC 2 explicou 20,87%, com isso a ACP explicou um total de 81,42% da variância dos dados.

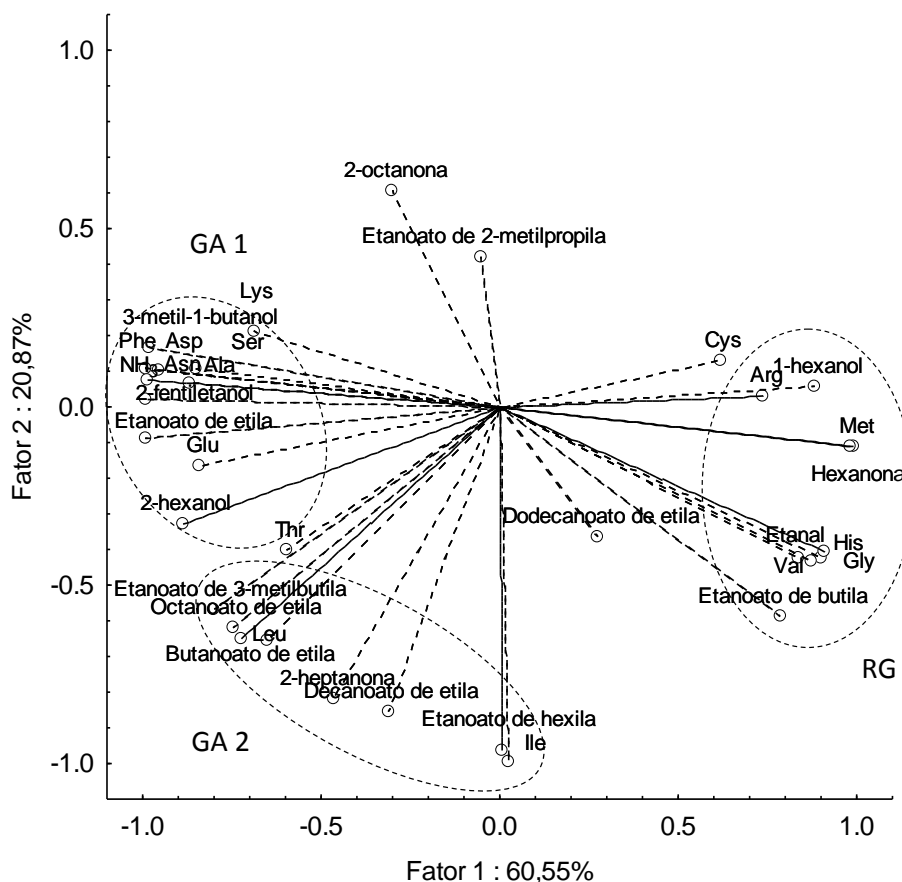


Figure 2.1 Scatter plot PC1 vs. PC2 para identificar as variáveis influenciadas pelas cepas de leveduras e cultivar de maçã. GA 1: sidras da cultivar Gala produzidas com as cepas Arome Plus, Aromatic e UFLA CA-11. GA 2: sidra da cultivar Gala produzidas com a cepa Bouquet. RG: sidras da cultivar Royal Gala produzidas com todas as cepas usadas.

As amostras foram separadas ao longo da primeira componente por diferenças observadas na maioria das variáveis, exceto para consumo de isoleucina e produção de etanoato de hexila e de decanoato de etila.

A similaridade das amostras foi avaliada usando análise hierárquica de grupos (AHG), o que corroborou com os resultados obtidos no ACP, onde as amostras foram agrupadas em três principais grupos: [1] sidras com a variedade Gala a partir das cepas *S. cerevisiae* Arome Plus, Aromatic e UFLA CA, [2] sidra com a variedade Gala com a cepa *S. cerevisiae* Bouquet, e [3] sidra com a variedade Royal Gala a partir das quatro cepas estudadas (Figura 2.1). Estes resultados indicam que os compostos voláteis produzidos com a cepa *S. cerevisiae* Bouquet

difere na presença de altas quantidades de aminoácidos das outras cepas com o mesmo mosto. Além disso, todas as sidras produzidas com um conteúdo inicial menor de aminoácidos ficaram agrupadas juntas, mostrando que nestas condições as cepas não exercem influência. Nas sidras feitas com a variedade Royal Gala, um alto conteúdo de etanal foi observado (Tabela 2.4) e o mesmo grupo de sidras foi identificado no ACP. Este composto demonstra ter uma relação direta em sidras preparadas com mostos de maçã contendo baixo teor de nitrogênio total.

Os aminoácidos que apresentaram uma influência positiva na quantidade e diferenciação de compostos voláteis, principalmente na produção de álcoois superiores (2-feniletanol e 3-metil-1-butanol) e ésteres etílicos (etanoato de etila), entre as cepas estudadas foram aspartato, asparagina, glutamato e alanina (Figura 2.1). Compostos como 3-metil-1-butanol, 2-feniletanol, 2-hexanol, etanoato de etila, etanoato de 3-metilbutila, octanoato de etila, butanoato de etila, decanoato de etila e etanoato de hexila podem ser considerados como parte da estrutura do aroma da fruta em sidras produzidas com maçãs de mesa.

As variáveis que não diferenciaram ($p > 0,05$) entre os grupos, e que com isso não influenciaram na separação dos grupos, foram justamente aquelas que permaneceram separadas dos três grupos, foram elas: o consumo de treonina, lisina e cisteína; e a produção de etanoato de 2-metilpropila, dodecanoato de etila e 2-octanona. Além destes, apenas três variáveis, butanoato de etila, etanoato de hexila e arginina, permaneceram agrupadas, mas não diferenciaram dos outros grupos e com isso, não influenciaram na separação.

4 CONCLUSÃO

No perfil de aminoácidos analisado neste trabalho, aspartato, asparagina e glutamato foram os principais compostos encontrados nos nove mostos de maçã estudados. O conteúdo total de aminoácidos mostrou variabilidade. Foi avaliado o efeito do conteúdo de aminoácidos em mosto de maçã sobre a formação de compostos voláteis. Sidras produzidas com baixo teor de nitrogênio ou de aminoácido mostraram fermentação interrompida / lenta e ao redor de 50% menor produção de compostos voláteis (independente da cepa de levedura utilizada), principalmente 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) e ésteres. AHG separou as amostras em três diferentes grupos, o que corroborou com o resultado da ACP, e sugeriu que aspartato, asparagina, glutamato e alanina foram os compostos que mais diferenciaram entre as cepas na produção de

álcoois superiores e ésteres etílicos. Compostos como 3-metil-1-butanol, 2-feniletanol, 2-hexanol, etanoato de etila, etanoato de 3-metilbutila, octanoato de etila, butanoato de etila, decanoato de etila e etanoato de hexila podem ser considerados como parte da estrutura da própria fruta na contribuição com aroma frutado em sidras preparadas com maçãs de mesa. Este estudo foi eficiente em indicar que uma alta concentração de aspartato, asparagina e glutamato em mosto de maçã é essencial para a produção de álcoois superiores e ésteres por leveduras aromáticas durante fermentação da sidra.

CAPÍTULO 3

PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE SUCOS E SIDRAS EM DIFERENTES CULTIVARES E ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DA MAÇÃ

PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE SUCOS E SIDRAS EM DIFERENTES CULTIVARES E ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DA MAÇÃ

RESUMO

A composição de aminoácidos da maçã é considerada essencial para a alimentação humana. Estes compostos têm inúmeros benefícios para a saúde e para as aplicações tecnológicas da fruta. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do estágio de maturação de frutas na composição de aminoácidos de sucos de diferentes cultivares de maçã e o efeito da fermentação sobre estes compostos. Foram avaliados 13 diferentes sucos de maçã com relação ao teor de nitrogênio total e suas composições em aminoácidos, e 3 diferentes cultivares em diferentes estádios de maturação (verde, madura e senescente) com relação ao teor de aminoácidos. A análise de aminoácidos foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Com relação ao teor de nitrogênio total foi possível verificar que a média de teor das cultivares é superior a 100 mg/L. Os aminoácidos aspartato, asparagina, glutamato e serina são os majoritários em todas as cultivares avaliadas e considerando os diferentes estádios de maturação inclui-se também nos majoritários o aminoácido alanina. Foi verificado ainda que os sucos em estádios de maturação verde apresentam a maior somatória de aminoácidos em relação aos outros dois estádios.

Palavras-chave: cultivar, maturação, aminoácidos.

1 INTRODUÇÃO

A maçã, dentre as frutas de clima temperado cultivadas no Brasil, foi aquela que apresentou maior expansão em área plantada e em volume de produção nos últimos trinta anos. Na safra 2012/2013 foram produzidas 1.375.512 toneladas de frutas correspondendo a 39.154 ha de área plantada. A maior concentração do cultivo está na Região Sul, sendo Santa Catarina o maior produtor, com aproximadamente 49,10% do total da área plantada. O Rio Grande do Sul, o segundo estado produtor, contribui com cerca de 45,90% do total da área plantada, seguido pelo

Paraná com 4,60%. A maior parte da produção provém das cultivares Gala e Fuji, representado 55% e 40% da produção, respectivamente (ABPM, 2014).

Fruta altamente nutritiva, contém carboidratos, proteínas e água, fontes indispensáveis para a alimentação. Em termos práticos, as proteínas são representadas sob a forma de aminoácidos, sendo constituídas na maçã principalmente por aspartato, asparagina, glutamato e serina, compostos fundamentais para a saúde humana e manutenção da qualidade das frutas (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). O consumo desta fruta está relacionado com a redução de riscos de desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e asma (HERFORTH, 2000; MARCHAND *et al.*, 2000).

O suco de maçã contém todos os nutrientes necessários para o crescimento das leveduras, sendo que a principal fonte de carbono e energia para este fim é proveniente de açúcares solúveis. Entretanto, como o nitrogênio é um nutriente limitante para o crescimento das leveduras, quando existe a deficiência deste composto ocorrem fermentações interrompidas e/ou lentas (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012; CRUZ; CILLI; ERNANDES, 2002; DRILLEAU, 1990).

A composição do suco e a cepa de levedura podem afetar a assimilação dos compostos nitrogenados (COLOMBIÉ; LATRILLE; SABLAYROLLES, 2007; JULIEN *et al.*, 2000; MANGINOT; ROUSTAN; SABLAYROLLES, 1998), assim como o metabolismo dos aminoácidos, a velocidade de fermentação, a cinética de produção de aromas e, conseqüentemente interferindo na qualidade do produto final (SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998; GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008; GOÑI; AZPILICUETA, 1999; INGLEDEW; KUNKEE, 1985; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012; OUGH; HUANG; STEVENS, 1991; PÉREZ-ZÚÑIGA; ABAD; CARTAGENA, 1997).

Muitos métodos já foram utilizados para determinação de aminoácidos em bebidas, incluindo cromatografia a gás por ionização de chama (KAMMERER; KAMMERER; CARLE, 2010), analisador de aminoácidos (YE; YUE; YUAN, 2014; LEI *et al.*, 2013) e cromatografia de troca iônica (FALLON; BOOTH; BELL, 1987; RODWELL, 1996). Na atualidade, as técnicas utilizando CLAE superam estes métodos, (BELTRAN *et al.*, 2007; GÓMEZ-ARIZA; VILLEGAS-PORTERO; BERNAL-DAZA, 2005).

Estudos têm enfatizado que o uso de CLAE é uma técnica segura para determinação de vários componentes dos alimentos, devido seu alto grau de precisão e seletividade. Dentre este componentes pode-se citar ácidos orgânicos (LIMA *et al.*, 2010), açúcares (ZIELINSKI *et al.*,

2014), compostos fenólicos (ALBERTI *et al.*, 2014), vitaminas (RODRIGUEZ *et al.*, 2012), corantes (MA *et al.*, 2006) e aminoácidos (ZHANG; LI; CHENG, 2010; GARAI-IBABE *et al.*, 2013).

Diferenças são observadas no conteúdo de aminoácidos entre os estádios de maturação da maçã. Conhecer estas diferenças pode ser importante para determinar o grau de maturidade tecnológica da fruta e a qualidade dos produtos derivados da mesma, como na sidra em que o teor de aminoácidos influencia a qualidade aromática da bebida, ou nos sucos e concentrados de frutas em que os aminoácidos participam da Reação de Maillard e do escurecimento enzimático (SANTOS *et al.*, 2015; BLANCO *et al.*, 1988).

O perfil de aminoácidos das frutas pode ser útil para o conhecimento de aspectos fisiológicos, nutricionais e tecnológicos. Com isso, o objetivo do presente capítulo foi avaliar a influência do estágio de maturação e do cultivar no perfil de aminoácidos de sucos de maçã e sidras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

O kit para análise de aminoácidos foi adquirido pela Waters (USA), o qual contempla além dos agentes derivatizantes e coluna cromatográfica, os padrões de aminoácidos para identificação e quantificação.

As variedades de maçã Gala, Red Delicious, Royal Gala e Grain Smith foram obtidas no mercado local de Ponta Grossa. As amostras de maçã Fuji Suprema, Lisgala, Eva e Carícia foram adquiridas pela Estação Experimental Companhia de Extensão Rural e Agrícola (EPAGRI – SC / Brasil). A segunda variedade da maçã Gala foi adquirida pela Agrícola Boutin (PR / Brasil).

As amostras de maçã se apresentavam no estágio maduro, e para as variedades Gala, Fuji Suprema e Lisgala também foram analisadas amostras nos estádios verde, madura e senescente.

As leveduras utilizadas para as fermentações foram *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet (Fermol Bouquet, ref. PB 2004, AEB Group, Bréscia, Italy).

2.2 Processamento de suco de maçã

As frutas foram selecionadas e lavadas, depois fragmentadas em um microprocessador (Metvisa, SC / Brasil). A massa ralada foi acondicionada em telas plásticas sobrepostas e submetida a uma pressão de 3 kgf/cm^2 por 5 min (Prensa hidráulica Eureka, Hoppe Ind. Ltd., Brazil). O suco foi tratado com pectinase (Pectinex_ Ultra Clear, Novozymes, Brazil) a uma concentração de 3 mL/hL (25 °C, 2 h) (ALBERTI *et al.*, 2011).

2.3 Processamento do fermentado de maçã

O mosto de maçã despetinizado (450 mL) foi colocado em cinco fermentadores, os quais consistiam de frascos tipo Erlenmeyers com volume de 500 mL, munidos de um sistema de batoque para liberação do dióxido de carbono em uma garrafa contendo solução de metabissulfito de potássio. A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet, em sua forma seca ativa, foi reidratada e inoculada segundo recomendações do fabricante. No décimo segundo dia, a fermentação foi interrompida e amostra foi centrifugado a 10200 g a 5 °C (Centrífuga Hitachi Himac CR21GII, Tokyo, Japan) por 20 min e então foi engarrafado e mantido a baixas temperaturas (-18 °C) até análises.

2.4 Análise cromatográfica dos aminoácidos

Os aminoácidos foram extraídos a partir de 3 mL de amostra com 2 mL de norleucina 0.25 mmol/L e centrifugadas a 13000 g por 20 min (Hitachi Himac CR 21 GII, Japão), o sobrenadante foi filtrado em seringas de nylon de 0,2 µm (Waters, USA). Os aminoácidos foram derivatizados usando um kit reagente Waters AccQ TagTM (frasco 1: 200 mmol/L tampão borato, pH 8.8; frasco 2A: AQC 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato; frasco 2B: acetonitrila). A identificação e quantificação foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando equipamento Alliance 2695 (Waters, MA, USA) equipado com detector de fluorescência Alliance 2475 (Waters, USA) e coluna Pico Tag (4 µm, 3.9 x 150 mm).

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia AccQ TagTM usando Kit completo da Waters (EUA). O sistema de eluição binário que foi usado consistiu de fase móvel A (acetato de sódio a 140 mmol/L e trietanolamina 17 mmol/L) e fase móvel B (60% acetonitrila).

O gradiente usado foi 0% B (0 min), 2% B (0,5 min), 7% B (15 min), 9% B (19 min), 12% B (22 min) e 30% B (33 min) seguido de lavagem e recondicionamento da coluna. Foram

usados na detecção por fluorescência comprimentos de onda para a excitação de 250 nm e para a emissão de 395 nm. Os picos foram identificados por comparação com tempo de retenção dos padrões autênticos, e a quantificação dos aminoácidos individuais foi feita baseada na área dos picos e nas curvas de calibração dos padrões puros (no mínimo em cinco concentrações diferentes).

2.5 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média \pm DP ou PSD, quando apropriado. A normalidade da distribuição dos dados foi verificada usando o teste Kolmogorov-Smirnov test e a igualdade de variâncias foi analisada pelo teste F (dois grupos) ou teste de Levene (três ou mais grupos). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste t-Student para amostras independentes ou por ANOVA (fator único). Os valores p abaixo de 0,05 foram usados para rejeitar a hipótese nula de similaridade / igualdade. Todas as análises estatísticas foram realizadas com software Statistica 7.0 (Statsoft Inc.).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil de aminoácidos e nitrogênio em maçãs

Foi possível avaliar que existe grande diferença no conteúdo dos aminoácidos nas diferentes amostras de maçã (Tabela 3.1). Essas diferenças são mais expressivas nos aminoácidos considerados majoritários da maçã, aspartato, asparagina, glutamato e serina.

Asparagina, aspartato e glutamato foram, em média, as maiores fontes de nitrogênio total da fruta (Tabela 3.1). Contribuem com 71,10% do total de teor médio aminoácidos da maçã (Figura 3.1), valores que corroboram outras pesquisas realizadas (DRILLEAU, 1993; SANTOS *et al.*, 2015; LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998).

Tabela 3.1 Estatística descritiva de 13 variedades de maçã.

Aminoácidos	MÍN (mg/L)	MÉD (mg/L)	MÁX (mg/L)	DP	CV (%)	P ANOVA
Aspartato	49,65	164,54	417,59	88,48	53,78	< 0,05
Serina	5,56	21,39	156,53	37,77	176,54	< 0,05
Asparagina	9,82	85,12	506,81	122,80	144,27	< 0,05
Glutamato	24,03	62,93	149,07	34,32	54,53	< 0,05
Glicina	7,31	9,8	13,92	3,59	36,64	< 0,05
Histidina	4,07	9,75	17,31	5,06	51,86	< 0,05
NH ₃	0,62	1,53	4,22	1,04	68,41	< 0,05
Arginina	6,26	12,74	24,17	6,88	53,96	< 0,05
Treonina	8,68	14,55	20,89	3,84	26,40	< 0,05
Alanina	11,71	21,13	49,29	10,42	49,30	< 0,05
Cisteína	4,07	4,4	4,85	0,33	7,49	< 0,05
Valina	2,97	3,26	3,94	0,46	14,04	< 0,05
Metionina	5,9	9,46	12,74	1,54	16,24	< 0,05
Lisina	5,21	7,03	14,23	2,2	31,27	< 0,05
Isoleucina	1,77	2,9	3,96	0,92	31,89	< 0,05
Leucina	3,17	7,06	17,67	4,23	59,89	< 0,05
Fenilalanina	1,42	2,07	3,5	0,62	29,91	< 0,05
Σ de aminoácidos	192,38	431,99	1183,84	233,41	54,03	-
Nitrogênio total	59,72	140,78	283,24	72,64	51,60	< 0,05

Os teores médios de nitrogênio total (Tabela 3.1) considerando todas as variedades estudadas foram maiores que 100 mg/L. Este valor poderia ser suficiente para produzir uma bebida fermentada instável com alto teor de nitrogênio residual, já que a levedura *S. cerevisiae* não é capaz de assimilar todo este conteúdo na fase de crescimento (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Estes valores elevados podem ser devido à adubação excessiva da fruta no campo (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Por outro lado, este valor pode ser favorável à formação de compostos voláteis em sidras, dependendo de sua composição em aminoácidos (SANTOS *et al.*, 2015).

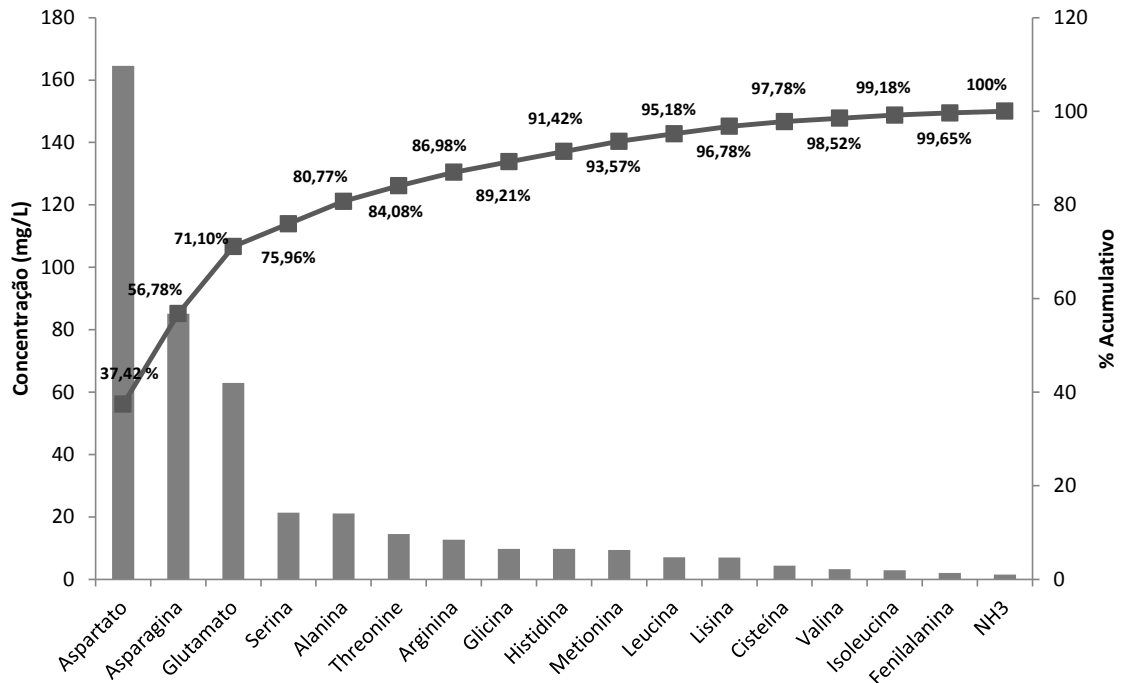


Figura 3.1 Gráfico de Pareto do perfil de aminoácidos de 13 (treze) diferentes cultivares de maçã.

Influência do estágio de maturação no teor de aminoácidos.

Para esta análise foram utilizadas as variedades Gala, Fuji Suprema e Lisgala nos estádios verde, madura e senescente, esta escolha foi feita com base na contribuição destas variedades para o cultivo brasileiro (96% do total) (ABPM, 2014). Foi possível avaliar o perfil de aminoácidos das diferentes cultivares e também o comportamento destes com a evolução do estágio de maturação (Tabela 3.2).

O cultivar Gala possui a maior somatória de aminoácidos nos três estádios de maturação, sendo no estágio verde a maior concentração (1183,84 mg/L), apresentando quase três vezes o valor da cultivar Lisgala, que possui a menor somatória (351,89 mg/L) (Tabela 3.2).

Nos três estádios avaliados neste trabalho os aminoácidos majoritários são aspartato, asparagina e glutamato, resultado similar ao relatado por Blanco *et al.* (1988), Lequeré e Drilleau (1998) e Ye, Yue e Yuan (2007). As pequenas diferenças observadas em relação às outras referências podem ser atribuídas às diferentes áreas de produção, idade dos pomares, cultivares e estádios de maturação (YE; YUE; YUAN, 2014; NOGUEIRA; LEQUÉRÉ; BULDIN, 2003).

Tabela 3.2 Concentração de aminoácidos em amostras de suco de maçã feitos com as variedades de maçã *Fuji Suprema*, *Lisgala* e *Gala* nos estádios verde, madura e senescente.

Aminoácidos (mg/L)	Gala			Fuji			Lisgala			PSD			
	Verde	Madura	Senescente	Verde	Madura	Senescente	Verde	Madura	Senescente				
Aspartato	188,54 ^d	350,14 ^b	417,59 ^a	↑	138,90 ^e	91,60 ^f	140,15 ^e	=	97,75 ^f	141,47 ^e	222,09 ^c	↑	109,68
Serina	156,53 ^a	18,38 ^b	17,70 ^b	↓	14,88 ^c	11,03 ^{de}	9,85 ^e	↓	11,58 ^d	12,56 ^d	6,46 ^f	↓	46,18
Asparagina	506,81 ^a	52,02 ^b	49,77 ^b	↓	40,48 ^c	27,82 ^{de}	23,94 ^e	↓	29,62 ^d	32,87 ^d	12,79 ^f	↓	152,02
Glutamato	149,07 ^a	84,02 ^c	75,07 ^d	↓	102,88 ^b	38,75 ^f	32,78 ^g	↓	74,03 ^d	104,79 ^b	58,68 ^e	↓	34,62
Glicine	13,92	nd	nd	↓	nd	nd	nd		nd	nd	nd		-
Histidina	nd	13,77 ^b	17,31 ^a	↑	9,77 ^e	10,91 ^d	16,83 ^a	↑	nd	12,30 ^c	9,85 ^e	↓	6,09
NH ₃	1,04 ^{cd}	1,79 ^a	1,45 ^b	↑	0,62 ^e	1,09 ^c	1,06 ^c	↑	1,78 ^a	1,14 ^c	0,91 ^d	↓	0,38
Arginina	24,17 ^a	nd	nd	↓	7,73 ^d	13,38 ^c	nd	↑	nd	nd	14,06 ^b	↑	8,52
Treonina	20,89 ^a	16,97 ^d	16,39 ^d	↓	12,17 ^f	18,47 ^c	15,62 ^e	↑	19,36 ^b	20,21 ^a	16,65 ^d	↓	2,60
Alanina	49,29 ^a	27,31 ^d	23,48 ^e	↓	14,45 ^g	16,96 ^f	37,36 ^b	↑	29,75 ^c	21,91 ^e	17,35 ^f	↓	10,99
Cisteína	nd	nd	nd		nd	nd	nd		nd	nd	nd		-
Valina	nd	nd	nd		3,94	nd	nd		nd	nd	nd		-
Methionine	10,48 ^c	12,10 ^b	12,74 ^a	↑	8,42 ^e	7,56 ^f	9,02 ^d	↑	9,04 ^d	10,65 ^c	10,79 ^c	↑	1,65
Lisina	14,23 ^a	6,28 ^d	7,52 ^b	↓	6,93 ^c	5,74 ^e	nd	↓	7,38 ^b	6,28 ^d	6,25 ^d	↓	3,47
Isoleucina	nd	nd	nd		nd	nd	nd		nd	nd	nd		-
Leucina	nd	6,84 ^d	6,04 ^e	↓	6,84 ^d	11,49 ^b	12,66 ^b	↑	7,86 ^c	17,67 ^a	7,66 ^c	=	4,72
Fenilalanina	nd	2,49 ^a	2,29 ^b	↓	1,49 ^f	1,48 ^f	1,99 ^c	↑	1,42 ^f	1,68 ^e	1,85 ^d	↑	0,69
TOTAL	1183,84	639,06	690,07		396,71	301,23	351,06		351,89	449,60	433,93		-

Nota: nd = não detectado; diferentes letras na mesma linha representam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$); dados são médias de três replicatas.

Os sucos em estádios de maturação verde apresentaram a maior somatória de aminoácidos em relação aos outros dois estádios, com exceção da variedade Lisgala (Tabela 3.2). Os aminoácidos que foram consumidos com o avanço da maturação nos diferentes cultivares de maçãs analisados foram serina, asparagina, glutamato e lisina. Alguns aminoácidos apresentaram comportamento diferenciado dependendo do cultivar analisado. No cultivar Gala os seguintes aminoácidos também tiveram seus teores reduzidos com o aumento do estágio de maturação arginina, treonina, alanina, leucina e fenilalanina. No cultivar Lisgala os aminoácidos NH₃, treonina e alanina, tiveram seus teores reduzidos. Os únicos aminoácidos que mantiveram os teores durante a maturação foram aspartato e leucina nos cultivares Fuji e Lisgala, respectivamente. No trabalho realizado por Blanco *et al.* (1988), no qual avaliaram o teor de aminoácidos em diferentes cultivares e em diferentes estádios de maturação, foi verificado que somente os aminoácidos asparagina e fenilalanina diminuíram seus teores com a evolução da maturação. Kuneman, Braddock e McChesney (1988) concluíram que este comportamento de

redução geral dos aminoácidos com o avanço da maturação poder ser devido ao processo de síntese protéica ou ainda ao efeito de diluição dos aminoácidos. Na variedade Lisgala, o aumento geral dos aminoácidos durante a evolução da maturação pode estar relacionada com a síntese de antocianinas e fenóis (BLANCO *et al.*, 1988)

A asparagina possui uma atividade de síntese proteica na desaminação e transaminação do nitrogênio total, o que explica a sua redução durante o amadurecimento da fruta, comportamento que não foi observado para a variedade Lisgala (YIP; YANG, 1988). A persistente redução deste aminoácido no final da maturação, para a maioria das variedades, pode ocorrer devido à atividade da asparaginase, com consequente acúmulo de aspartato neste período, justificando assim o aumento deste durante a maturação.

Os aminoácidos que apresentaram a mesma tendência de comportamento com o avanço da maturidade nos três cultivares analisados foram serina, asparagina, glutamato, lisina e metionina. Portanto estes aminoácidos possuem potencial para serem usados como marcadores de maturação nas maçãs.

A diminuição dos aminoácidos com o avanço da maturação pode ser atribuída à atividade proteolítica que ocorre na fruta, produção de antocianinas e fenóis (no caso do aminoácido fenilalanina), ou na produção de compostos voláteis como os ésteres (BLANCO *et al.*, 1988; ALCAIDE-HIDALGO *et al.*, 2007).

Aspectos nutricionais dos aminoácidos

Os aminoácidos possuem papel fundamental na dieta humana, estão relacionados com a manutenção da saúde e dos tecidos e possuem uma estreita relação com a redução de doenças de pele (MCCONATHY; GOODMAN, 2008).

Avaliando os aminoácidos majoritários encontrados nas variedades de maçã estudadas neste capítulo, pode-se verificar que estes apresentam importantes funções para a manutenção da saúde humana. O aspartato está associado à regulação do crescimento de células nervosas, melhorando memória e aprendizagem, e regulação da atividade reprodutiva (KIM *et al.*, 2010; MACCHIA *et al.*, 2006). A asparagina é usada no tratamento da leucemia (PIETERS *et al.*, 2011).

O glutamato tem um importante papel no metabolismo celular, na transmissão neural e na oxidação celular, este é o neurotransmissor mais importante no cérebro. A maior parte deste aminoácido é metabolizada no intestino sendo utilizado como fonte para produção de outros aminoácidos no organismo (JANECZKO *et al.*, 2007; REEDS *et al.*, 2000; HAWKINS, 2009; HUANG; DU, 2009).

A serina possui papel bioquímico no corpo humano, sendo relacionada como um agente terapêutico para doenças neurológicas (esquizofrenia, Alzheimer e perda de memória devido ao avanço de idade) (LABRIE *et al.*, 2009; HASHIMOTO *et al.*, 2004; MOTHET *et al.*, 2006), assim como tem sido associada como um agente que melhora a dor e transtornos de ansiedade (MUTH-SELBACH *et al.*, 2004; MATSUDA *et al.*, 2010).

A associação do consumo dos aminoácidos serina, aspartato, asparagina e treonina está relacionada com uma redução de problemas relacionados à opacidade na visão (HOOI; TRUSCOTT, 2010).

Influência da fermentação sobre os aminoácidos

As leveduras *S. cerevisiae* são capazes de distinguir entre fontes boas e fontes ruins de nitrogênio para a fermentação. Dentre os aminoácidos identificados nos sucos analisados, aspartato, glutamato e asparagina são consideradas fontes rapidamente assimiláveis pela levedura *S. cerevisiae* (PRETORIUS, 2000). Estes aminoácidos estão justamente entre os majoritários, e a presença deles reprime o efeito que fontes ruins poderiam ter sobre o processo fermentativo (PRETORIUS, 2000).

Analisando os valores finais de aminoácidos das amostras de sidra é possível observar, de forma geral, vários níveis de consumo destes compostos pela levedura *S. cerevisiae* (Tabela 3.3). Nas amostras verdes o percentual de consumo médio durante a fermentação foi de 92,33%, já para as maduras foi 90,24% e para as senescentes foi de 90,64%. Isso pode indicar que os aminoácidos se encontram na forma disponível para as leveduras em qualquer estágio de maturação.

Tabela 3.3 Concentração de aminoácidos das sidras feitas com maçãs das variedades *Fuji Suprema*, *Lisgala* ou *Gala* nos estágios de maturação verde, madura ou senescente.

Aminoácidos (mg/L)	Gala			Fuji			Lisgala			PSD
	Verde	Madura	Senescente	Verde	Madura	Senescente	Verde	Madura	Senescente	
Aspartato	6,04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
Serina	2,78 ^a	2,70 ^c	2,80 ^a	2,66 ^d	nd	nd	nd	2,75 ^b	2,66 ^d	1,31
Asparagina	0,66 ^b	0,38 ^d	0,78 ^a	0,28 ^e	nd	nd	nd	0,55 ^c	0,26 ^f	0,28
Glutamato	nd	5,66 ^b	9,51 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,38
Glicina	5,15 ^a	3,13 ^c	4,41 ^b	2,87 ^d	nd	nd	nd	nd	nd	2,07
Histidina	5,28 ^e	4,89 ^{ef}	7,58 ^b	4,47 ^f	5,86 ^d	6,23 ^c	nd	13,77 ^a	nd	3,97
NH ₃	0,78 ^a	0,45 ^b	0,20 ^d	0,10 ^f	0,27 ^c	0,16 ^e	0,17 ^e	0,08 ^f	0,22 ^d	0,21
Arginina	6,56 ^a	6,33 ^b	5,88 ^{ef}	6,00 ^c	5,97 ^{cd}	5,76 ^{fg}	nd	5,66 ^g	5,01 ^h	1,93
Treonina	4,09 ^a	nd	4,00 ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,71
Alanina	8,01 ^a	3,26 ^d	7,86 ^b	3,00 ^e	nd	nd	2,99 ^e	4,76 ^c	3,03 ^e	2,76
Cisteína	nd	nd	nd	4,25 ^a	nd	nd	nd	nd	4,10 ^b	1,77
Valina	3,70 ^a	nd	3,19 ^b	2,82 ^c	nd	nd	nd	nd	2,77 ^d	1,60
Metionina	5,46 ^a	4,47 ^c	4,76 ^b	4,35 ^d	nd	nd	nd	nd	nd	2,43
Lisina	5,26 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,08 ^b	2,19
Isoleucina	14,63 ^b	4,40 ^c	28,77 ^a	1,96 ^e	nd	nd	nd	nd	2,53 ^d	9,41
Leucina	5,55 ^e	10,66 ^b	5,35 ^f	7,16 ^c	19,05 ^a	3,55 ^g	6,84 ^d	3,65 ^g	3,59 ^g	4,77
Fenilalanina	1,13 ^a	nd	1,03 ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,46
TOTAL	88,40	51,90	94,10	43,96	38,40	23,13	15,84	37,81	34,11	-

Nota: nd = não detectado; diferentes letras na mesma linha representam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$); dados são médias de três replicatas.

É possível perceber que o consumo de aminoácidos ocorre de forma aleatória durante o processo fermentativo (Tabela 3.3). Este comportamento é também observado quando se usam cepas de leveduras diferentes (VALLES *et al.*, 2005). O aminoácido aspartato foi totalmente consumido em praticamente todas as amostras, permanecendo um residual apenas na amostra Gala verde. Os aminoácidos serina, asparagina, glutamato, NH₃, treonina, alanina, metionina e lisina foram consumidos em todas as amostras fermentadas, sendo estes junto com o aspartato os maiores contribuintes para as necessidades de nitrogênio das leveduras e para o metabolismo secundário.

Os aminoácidos com maiores índices de consumo durante a fermentação foram aspartato, asparagina e glutamato. Sendo que, estes compostos estavam também entre os majoritários do suco, o que demonstra que existe uma relação direta entre o teor inicial de aminoácidos e o consumo deste (GARDEN-CERDAN; ANCIN-AZPILICUETA, 2008).

O consumo destes componentes ocorre por duas razões principais, para o crescimento das leveduras e para o metabolismo secundário na produção de compostos voláteis (VALLES *et al.*, 2005; GAMERO *et al.*, 2011).

Na amostra de sidra de Gala verde foram produzidos os seguintes aminoácidos histidina, valina, isoleucina e fenilalanina (Tabela 3.3). Na amostra de sidra de Gala madura foram produzidos os seguintes aminoácidos glicina, arginina, isoleucina e leucina. Na amostra de sidra feita com Gala senescente os aminoácidos produzidos foram glicina, arginina, cisteína e valina. Na sidra de Fuji verde os aminoácidos produzidos foram glicina, isoleucina e leucina. A sidra com Fuji madura produziu apenas o aminoácido leucina, e neste cultivar senescente a arginina. A sidra com Lisgala madura produziu arginina e a sidra com Lisgala senescente produziu cisteína, valina e isoleucina. Estes aumentos nos teores de aminoácidos podem ter ocorrido pela conversão que é possível entre estes compostos ou pela autólise das células que ocorre nos estágios finais de fermentação (YE; YUE; YUAN, 2014).

Foi feita uma correlação dos dados de consumo de aminoácidos durante a fermentação (AA suco - AA sidra) para verificar se existe tendência de comportamento destes compostos durante a fermentação. Foi possível observar que as correlações mais altas ($r > 0.70$ e $p < 0.05$) foram entre: [1] aspartato com isoleucina de forma inversa, ou seja, o aspartato foi extensivamente consumido pela levedura, e ocorreu pequena produção de isoleucina; [2] serina com asparagina, glutamato, glicina e arginina; [3] asparagina com glutamato, glicina e arginina; [4] glicina com arginina; [5] histidina com fenilalanina e inversamente com lisina, glutamato e glicina; [6] NH_3 de forma inversa com arginina; [7] valina com isoleucina; [8] isoleucina com aspartato e valina; [9] e a fenilalanina se correlacionou inversamente com o consumo dos seguintes aminoácidos, serina, asparagina, glutamato, glicina e arginina. Estes dados sugerem que o consumo destes aminoácidos não ocorre de forma aleatória, e sim que o consumo de um favorece o consumo do outro.

Uma aplicação seria, em mostos de maçã, com baixos teores de nitrogênio total, suplementar com estes aminoácidos, que são correlacionados entre si, o que favorece o consumo durante o processo fermentativo, evitando fermentações interrompidas e favorecendo a produção de compostos voláteis (VALLES *et al.*, 2005; KELKAR; DOLAN, 2012; BISSON; BUTZKE, 2000). É possível observar também que a demanda de nitrogênio em condições de excesso deste nutriente, não necessariamente resultará em condições diferente de fermentação. Por exemplo, o

mosto de Gala verde, com teor mais elevado de aminoácidos, não apresentou cinética de fermentação diferente do mosto Fuji madura, com menor teor de aminoácidos (velocidade de fermentação de $12,00 \pm 0,01$ g/L.dia e liberação de CO_2 de $60,00 \pm 0,01$ g/L), isto porque o teor de nitrogênio total das duas amostras foram suficientes (ao redor de 100 mg/L) para o bom andamento da fermentação (ALBERTI *et al.*, 2011).

4 CONCLUSÃO

Foi possível perceber que existe diferença nos conteúdos de aminoácidos entre diferentes cultivares de maçã. Estas diferenças não se limitam a apenas um aminoácido, mas sim à combinação entre eles, sendo que os aminoácidos majoritários em todas as amostras analisadas foram aspartato, asparagina e glutamato.

Estes aminoácidos majoritários possuem importantes características nutricionais e tecnológicas. É possível usar esta informação sobre os aminoácidos disponíveis na maçã para procedimentos de correção de mosto ou suco, favorecendo a qualidade da sidra assim como os aspectos nutricionais dos sucos.

Estas diferenças no conteúdo dos aminoácidos também acontecem entre os estádios de maturação, sendo que os aminoácidos apresentaram diferentes comportamentos nos cultivares. Aspartato, asparagina, serina e metionina tiveram evolução semelhante durante o desenvolvimento da maturação para os três cultivares avaliados.

Durante a fermentação foi possível verificar que o consumo dos aminoácidos não ocorre de forma aleatória, e sim que o consumo de um favorece o consumo do outro. Os aminoácidos serina, asparagina, glutamato, NH_3 , treonina, alanina, metionina e lisina foram consumidos em todas as amostras fermentadas.

CAPÍTULO 4

ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM MOSTOS DE MAÇÃ PARA PADRONIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM SIDRAS

O conteúdo desse capítulo faz parte do resumo apresentado no “*16th World Congress of Food Science and Technology*” (Anexo II).

ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM MOSTOS DE MAÇÃ PARA PADRONIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM SIDRAS

RESUMO

O aroma frutado em sidras é um importante fator de qualidade para a bebida, porém não existe uma padronização na produção destes compostos. Sabe-se que os ésteres têm relação direta sobre a formação de aromas com notas frutais e florais em bebidas fermentadas de maçã. Esta pesquisa objetivou verificar a influência dos aminoácidos na produção de ésteres, assim como utilizar um mosto sintético para otimizar a produção destes compostos voláteis. Foi utilizado planejamento de misturas “simplex centroid” com 10 ensaios. Na superfície de resposta foi verificado que existem duas regiões de maximização na produção de ésteres, porém a combinação de aspartato e glutamato predisse uma produção mais elevada. As concentrações ótimas foram sugeridas com 43,44% de aspartato e 56,67% de glutamato. Na aplicação prática do modelo proposto, um mosto de maçã com baixo conteúdo de nitrogênio total foi suplementado com as condições sugeridas e submetido à fermentação. Após este processo foi verificado uma produção de quatro vezes mais ésteres do que no mosto sem a suplementação e submetido às mesmas condições de fermentação. Esta alternativa apresenta-se como uma proposta prática viável para a indústria de processamento de sidras na padronização de formação de aromas.

Palavras-chave: mosto sintético, aminoácidos, ésteres, aroma.

1 INTRODUÇÃO

Sidra é uma bebida gaseificada obtida pela fermentação alcoólica de mostos de maçãs de mesa ou maçãs industriais. Esta bebida possui diversos atributos sensoriais que podem variar entre produtores e países de produção como cor, turbidez, acidez, adstringência, doçura, carbonatação e espuma. Entretanto o aroma frutado é um dos mais significativos indicadores de

qualidade, e não existe uma padronização destes compostos (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012; XU; ZHAO; WANG, 2006; LEA; DRILLEAU, 2003; DRILLEAU, 1993; LEQUÉRÉ, 1992).

Algumas classes de voláteis como ésteres (78 a 92% do total), álcoois superiores (6 a 16% do total), ácidos carboxílicos, cetonas e aldeídos são formados pelas leveduras durante a fermentação da sidra, e favorecem a produção de aroma frutado (RITA *et al.*, 2011; GAMERO *et al.*, 2011; HERRERO GARCÍA; DÍAZ, 2006). Os aminoácidos encontrados no mosto inicial de maçã são os precursores intermediários mais relevantes na biossíntese da maioria dos compostos voláteis (ARDO, 2006).

Nitrogênio é encontrado nas maçãs principalmente na forma de aminoácidos, como asparagina, glutamina, aspartato, glutamato e serina, que junto somam de 86 a 95% da porção de nitrogênio do suco (LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998; SANTOS *et al.*, 2015). De acordo com Alberti *et al.* (2011), o conteúdo de nitrogênio disponível para as leveduras em sucos de maçã é, em média, 120 mg/L, sendo este nutriente considerado um nutriente limitante para o crescimento das células e para as atividades fermentativas durante os estágios iniciais da fermentação alcoólica (BARBOSA; MENDES-FAIA; MENDES-FERREIRA, 2012).

Durante a fermentação, eles são absorvidos pelo sistema de transporte da membrana das células (GAP – geral permeasse aminoácido), e estes são usados principalmente pela via metabólica de Ehrlich, através da qual muitos compostos voláteis são formados. Nesta via metabólica a levedura produz álcoois superiores a partir dos aminoácidos e uma parte destes álcoois é esterificado ou produzido a partir de vias enzimáticas (STYGER; PRIOR; BAUER, 2011; WIPF *et al.*, 2002; PRETORIUS, 2000). A velocidade de assimilação destes compostos é variável, dependendo do funcionamento dos sistemas de transportes e dos aminoácidos em si, alguns são assimilados mais facilmente (aspartato e asparagina, por exemplo) (RIBEREAU-GAYON; DUBOURDIEU; LONVAUD, 1998).

Santos *et al.* (2015) relatou que sucos de maçã com uma concentração mais elevada de aminoácidos submetidos à fermentação com *S. cerevisiae* Bouquet produzem concentração mais elevada de compostos voláteis que contribuem para aroma frutal e floral na sidra. Na sidra, os aminoácidos aspartato, asparagina e glutamato apresentam correlação na produção de 3-metil-1-butanol, 2-feniletanol, 2-hexanol, etanoato de etila, etanoato de 3-metilbutila, octanoato de etila, butanoato de etila, decanoato de etila e etanoato de hexila (SANTOS *et al.*, 2015).

Os ésteres possuem uma relação direta com a formação de aroma frutado em bebidas fermentadas (STYGER; PRIOR; BAUER, 2011; GAMERO *et al.*, 2013; YE; YUE; YUAN, 2014). A concentração destes compostos voláteis após o processo fermentativo depende de vários fatores, entre eles a cepa de levedura e a quantidade de aminoácidos do mosto inicial (COLE; NOBLE, 1995). Os ésteres responsáveis pela formação de aroma frutado nas sidras são etanoato de etila, etanoato de 2-feniletila, hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, butanoato de 2-metiletila e butanoato de etila (SAERENS *et al.*, 2008; PIETROWSKI *et al.*, 2012; SANCHO; RAO; DOWNING, 1997; BRAGA *et al.*, 2013).

A influência de cada aminoácido, de forma isolada, sobre a formação de aromas na sidra tem sido pouco estudada, e também se percebe a necessidade de padronização dos aromas na sidra visando melhorar a qualidade da bebida. Com isso, o objetivo deste capítulo foi identificar os aminoácidos que estão relacionados com a produção de aroma frutado em sidras através do uso de mosto sintético, e otimizar a produção de ésteres.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

As maçãs Gala e Fuji foram adquiridas da Estação Experimental de Extensão Rural e Agrícola (EPAGRI, SC – Brasil) (safra 2011 / 2012).

A cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet (AEB Group, Itália) foi utilizada na forma seca, ativa, reidratada e inoculada com uma população inicial de 2.0×10^6 ufc/mL.

As vitaminas (mioinositol, ácido nicotínico, ácido pantotênico, tiamina, piridoxina e biotina) e os aminoácidos (aspartato, asparagina, glutamato e serina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha), e os sais da Vetec Química Fina LTDA (Brasil). Os ácidos málico e os açúcares foram adquiridos da Biotec Química LTDA (Brasil).

Os padrões de compostos voláteis etanal, propanoato de etila, butanoato de etil 3-metila, etanoato de propila, etanoato de 2-metil propila, butanoato de etila, hexanona, 2-heptanona, 2-metil-1-butanol, 2-hexanol, 2-octanona e hexanoato de etila foram adquiridos pela Interchim (Montluçon, França). Etanoato de etila, etanoato de butila, etanoato de 3-metilbutila, etanoato de hexila, propanoato de 2-hidroxi etila, 1-hexanol, octanoato de etila, decanoato de etila, ácido butanoico, butanedioato de dietila, 2-feniletanol, dodecanoato de etila e ácido octanóico foram

adquiridos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). 3-metil-1-butanol foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os reagentes químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico. As soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultra-pura (Millipore, São Paulo, Brasil).

2.2 Formulação do mosto sintético e do fermentado sintético

O mosto foi produzido de acordo com Salmon; Fornairon; Barre (1998), com algumas modificações: 89,63 g de glucose, 38,97 g de frutose, 2,43 mg de ácido málico, 20 mg de mioinositol, 2 mg de ácido nicotínico, 1,5 mg de ácido pantotênico, 0,25 mg de tiamina, 0,25 mg de piridoxina, 0,1 mg de biotina (as vitaminas foram adicionadas sem agitar a mistura), 750 mg fosfato de potássio di-hidratado, 252 mg of sulfato de potássio, 99 mg de sulfato de magnésio heptahidratado, 155 mg de cloreto de cálcio di-hidratado, 200 mg de cloreto de cálcio, 4 mg de sulfato de manganês monohidratado, 4 mg de sulfato de zinco heptahidratado, 1 mg de sulfato de cobre pentahidratado, 1 mg de iodeto e potássio, 0,5 mg de cloreto de cobalto hexahidratado, 1 mg de ácido bórico, 1 mg de molibdato de amônio, 120 mg de nitrogênio na forma de aminoácidos (aspartato, glutamato, asparagina e serina – a adição foi baseada na quantidade de nitrogênio em cada molécula de aminoácido, e água destilada para completar 1 litro de mosto (LEQUÉRE; DRILLEAU, 1998; WOSIACKI *et al.*, 2008; ALBERTI *et al.*, 2011). O mosto sintético padrão com os quatro aminoácidos adicionados ao mesmo tempo recebeu a sigla de identificação SSM, e será assim denominado durante todo o trabalho.

Os aminoácidos aspartato (Asp), asparagina (Asn), glutamato (Glu) e serina (Ser) foram adicionados de forma isolada no mosto sintético (correspondendo a 120 mg/L de nitrogênio total) para avaliar a influência de cada um sobre a formação de compostos voláteis. A escolha destes aminoácidos foi baseada em referências prévias sobre o conteúdo de aminoácidos em maçãs (LÉQUERE; DRILLEAU, 1998; GARAI-IBABE *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2015).

Para a fermentação, utilizados frascos tipo Erlenmeyers de 250 mL equipados com uma borracha e inoculados com *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet, com volume de mosto de 200 mL. A temperatura ambiente foi de 20 ± 1 °C. O dióxido de carbono liberado causa uma redução da massa dos fermentadores e isto torna possível calcular os parâmetros de cinética como tempo de fermentação (até peso constante) e velocidade de fermentação (dCO_2/dt) (BELY; SABLAYROLLES; BARRE,1990; ALBERTI *et al.*, 2011). A população de leveduras foi

monitorada com o uso de câmara de Neubauer (XB-K-25, SMIC, China) (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

Os fermentados foram centrifugados a 10200 g em 4 °C por 20 minutos (Hitachi Himac CR 21 GII, Japão) e o sobrenadante foi separado, armazenado em garrafas de 500 mL e estocados a -18 °C até futuras análises.

2.3 Processamento do mosto de maçã e sidra

As variedades de maçã Gala e Royal Gala foram usadas para o processamento de suco e sidra. As frutas foram selecionadas e limpas e então fragmentadas em microprocessador (Metvisa, Brasil). Esta massa foi embalada em telas plásticas, superpostas e submetidas a uma pressão de 3,0 kgf/cm² por 5 min (Hoppe Ind. Ltda., Brazil). O suco foi tratado com pectinase (Pectinex, Novozymes, Brasil) a uma taxa 3,0 mL/hL (25 °C por 2 h). O processo de fermentação ocorreu conforme descrito para mostos sintéticos.

A amostra de sidra com a variedade Gala foi produzida a fim de comparar o comportamento de fermentação com o mosto sintético, devido esta cultivar estar entre as cinco mais produzidas no mundo (SHAO *et al.*, 2010). Já as amostras com a variedade Royal Gala foram feitas para a aplicação dos resultados do planejamento fatorial em um mosto de maçã com baixo teor de nitrogênio.

2.4 Planejamento experimental

O delineamento experimental foi realizado para verificar a influência dos aminoácidos na formação de compostos aromáticos. Os aminoácidos que apresentaram o maior teor de ésteres (fator resposta) nas fermentações sintéticas foram aspartato, glutamato e asparagina, e por isso foram utilizados no planejamento de misturas. A somatória de ésteres foi definida como fator resposta com base na importância dos ésteres para a sensação do aroma frutado e floral em bebidas fermentadas de frutas (GAMERO *et al.*, 2013).

Mostos de maçã sintéticos foram preparados de acordo com um planejamento *simplex-centroid*, contendo dez diferentes misturas (aminoácidos isolados, misturas binárias e ternárias) (Tabela 4.1). A concentração dos aminoácidos nas misturas foi feita de modo que o teor de nitrogênio total dos mostos ficasse igual a 120 mg/L. Este teor foi definido devido ser o teor médio disponível para as leveduras, sendo suficiente para o máximo crescimento de células e

máxima atividade fermentativa, evitando fermentação lenta ou interrompida (ALBERTI *et al.*, 2011).

Tabela 4.1 Planejamento fatorial “simplex-centroid” aumentado para dez tratamentos de misturas de aspartato, glutamato e asparagina.

Ensaio	Proporção de cada aminoácido na mistura	Quantidades de cada aminoácido (g/200mL de mosto)		
		Aspartato	Glutamato	Asparagina
1	(1;0;0)	0,228	0,000	0,000
2	(0;1;0)	0,000	0,252	0,000
3	(0,0,1)	0,000	0,000	0,114
4	(0,5; 0,5; 0)	0,114	0,126	0,000
5	(0,5; 0; 0,5)	0,114	0,000	0,057
6	(0; 0,5; 0,5)	0,000	0,126	0,057
7	(0,33; 0,33; 0,33)	0,076	0,084	0,038
8	(0,66; 0,17; 0,17)	0,152	0,042	0,019
9	(1/6; 0,66; 1/6)	0,038	0,168	0,019
10	(0,17; 0,17; 0,66)	0,038	0,042	0,075

2.5 Análise cromatográfica dos compostos voláteis

Amostras (6 mL) de suco de maçã ou sidra foram colocadas em frascos de vidro de 20 mL. Após, foram adicionados 50 µL de padrão interno (ácido heptanóico). Antes da injeção, as amostras foram mantidas a 60 °C por 10 minutos sob agitação no forno do injetor automático (Cromatógrafo a Gás Young Lin Instrument, Anyang, Korea). A captura dos compostos foi feita no *headspace* de acordo com o método descrito por Pietrowski *et al.* (2012). A análise de compostos aromáticos foi feita por cromatografia a gás, usando o equipamento Young Lin Instrument – (YL 6100 GC, Anyang, Korea) equipado com FID, coluna capilar (30 m x 25 mm, 0,25µm de espessura e filme ZB-WAX; Phenomenex, CA, EUA) e detector por ionização de chama. A temperatura de injeção foi 220 °C e a temperatura de detecção foi de 230 °C. O gás de arraste foi nitrogênio, com um fluxo de 2,5 mL/min, e a técnica de injeção foi Split 1:1,2. As condições de análise foram programadas com uma temperatura inicial de 40 °C por 5 minutos, com um aumento de 10 °C/min até 150 °C, mantendo esta temperatura por 10 minutos. A temperatura foi então aumentada por 10 °C/min até 200 °C por 5 minutos e finalmente aumentou em 10 °C/min até 220 °C, onde foi mantida 16 minutos. O método de injeção automática do CG foi usado com um volume de 1500 µL (CORDENTE *et al.*, 2012). A quantificação foi realizada por curva de calibração de padrões, e as determinações foram realizadas em triplicatas.

2.6 Análise cromatográfica dos aminoácidos

Os aminoácidos foram extraídos a partir de 3 mL de amostras com 2 mL de norleucina 0,25 mmol/L (usada para taxas de recuperação). A mistura foi centrifugada a 13000 g, 4 °C por 20 minutos (Centrífuga Hitachi Himac CR 21 GII, Japão) e o sobrenadante foi filtrado em seringa de nylon de 0,2 µm (Waters, EUA). Os aminoácidos foram derivatizados usando um Kit de reagente AccQ Tag™ da Waters (frasco 1: 200 mmol/L de tampão borato, pH 8,8; frasco 2: carbamato de 6-aminoquinolil-N-hydroxysuccinimidil, AQC; frasco 2B: acetonitrila). A identificação e quantificação foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando um equipamento Alliance 2695 (Waters, MA, EUA) equipado com detector de fluorescência Alliance 2475 (Waters, USA) e uma coluna Pico Tag (4 µm, 3.9 x 150 mm).

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia AccQ Tag™ usando um Kit completo da Waters (USA). Um sistema de eluição binário foi usado, que consistiu de Fase Móvel A (140 mmol/L de acetato de sódio e 17 mmol/L de trietanolamina) e Fase Móvel B (Acetonitrila 60%). O gradiente de fase móvel utilizado foi 0% B (0 min), 2% B (0.5 min), 7% B (15 min), 9% B (19 min), 12% B (22 min) e 30% B (33 min) seguido pela lavagem e condicionamento da coluna. No detector de fluorescência foram usados comprimentos de onda para a excitação de 250 nm e para a emissão de 395 nm. Os picos foram identificados por comparação do tempo de retenção com os cromatogramas dos padrões de aminoácidos, e a quantificação dos aminoácidos individuais foi verificada baseada em área do pico das curvas de calibração destes padrões (em pelo menos cinco concentrações).

2.7 Análises físico-químicas

O ácido málico foi determinado por titulação (expresso em g/L), acidez volátil foi expressa como ácido acético (g/L) (IAL, 2008), e nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal (mg/L) (BARON; BOHUON; DRILLEAU, 1977). As análises de açúcares redutores totais (ART) foram realizadas segundo o método tradicional de Somogyi-Nelson (TANNER; BRUNNER, 1985). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

O álcool foi destilado e determinado por Densimetria (Microviscosímetro, Lovis 2000 ME – Anton Paar).

2.8 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm DP ou PSD, quando apropriado. A normalidade da distribuição dos dados foi verificada usando o teste Kolmogorov-Smirnov e a variância foi analisada fazendo-se teste F (dois grupos) ou teste de Levene (três ou mais grupos). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelas médias do teste t -Student para amostras independentes (dois grupos) ou *one-factor* ANOVA seguido do teste LSD Fisher. P-valores abaixo de 0,05 foram usados para confirmar a hipótese de similaridade / igualdade.

Foi usada a metodologia de superfície de resposta (MSR) para modelar a soma de ésteres. Para isto, uma equação polinomial de segunda ordem foi usada para ajustar os dados experimentais. O modelo geral usado em MSR está demonstrado na Equação 1:

$$Y_{(n)ijk} (X) = \sum_{3i=1} b_{ixi} + \sum_{3i \leq 1} \sum_{3j} b_{ijxixj} + b_{ijkxixjxk} \quad (1)$$

Onde Y_n é a resposta predita, b_i , b_{ij} , e b_{ijk} são os coeficientes da regressão para termos lineares, quadráticos e cúbicos, respectivamente, e x_i , x_j e x_k são as variáveis independentes. A equação geral tem sua significância estatística examinada por ANOVA. O termo que não foi significativo pela ANOVA foi removido do modelo e o dado foi reajustado apenas para parâmetros significativos ($p < 0,05$), e a superfície foi construída. A proximidade do modelo ajustado foi avaliada pelo coeficiente de regressão (R^2) e seu valor ajustado. O modelo também teve a normalidade residual avaliada pelo teste Shapiro-Wilk.

Depois da modelagem, foi realizada uma otimização para maximizar a produção de ésteres usando a função de preferência proposta por Derringer e Suich (1980). A fim de verificar o poder da previsão dos modelos pela comparação dos valores preditos com os dados experimentais, foram realizados procedimentos experimentais e os resultados foram avaliados pelos intervalos de predição ao nível de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando Statistica 7.0 (StatSoft Inc., EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises do mosto sintético e do mosto de maçã

Analisando as diferenças entre os mostos iniciais, sabe-se que o sintético continha inicialmente 128,60 g/L de açúcares totais e 120,00 mg/L de nitrogênio total, e o de maçã 106,25

g/L de açúcares e 134,92 de nitrogênio total. Estes valores do mosto sintético foram determinados com base em concentrações médias existentes em sucos de maçã de diferentes variedades (WOSIACKI *et al.*, 2008; ALBERTI *et al.*, 2011). A amostra de mosto sintético padrão (SSM) teve parâmetros de cinética de fermentação similares ($p > 0,05$) ao mosto de maçã (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica de mosto de maçã e mosto sintético de maçã.

Parâmetros cinéticos	Mosto de maçã*	SSM**	PSD***	p (F-test)	p (Student-t test)
Tempo de fermentação (d)	11,33	10,67	0,58	0,25	0,06
Liberção de CO ₂ (g/L)	61,77	60,41	0,56	0,14	0,59
(dCO ₂ /dt) _{max} (g/L.d)	11,48	13,12	0,56	0,09	0,61
T _{max} (dias)	1,72	1,93	0,06	0,33	0,34
X _{max} (cel/mL)	6,73 x 10 ⁷	6,81 x 10 ⁷	2,00x10 ⁵	0,87	0,90

Nota: (dCO₂/dt)_{max} = velocidade máxima de fermentação; T_{max} = tempo para velocidade máxima de fermentação; X_{max} = máxima população de células. * Dados médios das variedades Gala e Fuji (n = 10); ** SSM = mosto sintético padrão. Os resultados expressos são médias de dados obtidos de diferentes fermentações em diferentes tempos (n = 8). ***PSD = desvio padrão combinado.

Com os resultados das análises físico-químicas (Tabela 4.3) foi possível verificar que o consumo de açúcares após 12 dias de fermentação (99,11%) e o consumo de nitrogênio total pelas leveduras (73,04%) estão em concordância com valores obtidos para sidras feitas com diferentes cultivares de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (ALBERTI *et al.*, 2011).

Tabela 4.3. Análises físico-químicas de mostos e fermentados sintéticos e de sidras.

Parâmetros de fermentação	Mostos		Fermentados	
	Apple***	SSM**	Apple***	SSM**
ART* (g/L)	106,25 ± 0,65 ^b	128,60 ± 0,01 ^a	1,78 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,01 ^b
Nitrogênio total (mg/L)	134,92 ± 5,13 ^a	120,00 ± 0,01 ^b	35,03 ± 0,90 ^a	35,55 ± 0,01 ^a
Etanol (% , v/v)	nd	nd	7,20 ± 0,10 ^a	7,20 ± 0,10 ^a

Nota: * ART = açúcares redutores totais; ** SSM = mosto sintético padrão; *** Média de dados para variedades Gala e Fuji (n = 10); ^{a, b, c} = letras diferentes na mesma linha significam diferenças estatísticas entre as amostras de mostos e fermentados ($p < 0,05$); nd = não detectado.

Após verificar que o mosto sintético teve comportamento de fermentação semelhante ao mosto de maçã ($p > 0,05$), foi possível avaliar a influência de cada aminoácido sobre a formação de compostos voláteis.

Os mostos sintéticos com aminoácidos adicionados isoladamente (aspartato, glutamato e asparagina) apresentaram consumo de nitrogênio total médio de 87,29 ± 2,06% durante a fermentação, valor próximo ao observado para fermentados de maçã (ALBERTI *et al.*, 2011; BRAGA *et al.*, 2013).

Compostos voláteis

Os compostos voláteis encontrados em maior concentração nas sidras e nos fermentados sintéticos com diferentes fontes de nitrogênio foram etanoato de etila, etanal, 2-feniletanol e 3-metil-1-butanol (Tabela 4.4). Todos estes foram identificados como compostos majoritários em sidras e, nas concentrações detectadas (variando entre 12,71 e 3482,77 mg/L) eles contribuem com notas florais e frutadas de aroma (CIANI; BECO; COMITINI, 2006; GARDEN-CERDAN; ANCIN-AZPILICUETA, 2008).

Tabela 4.4 Concentração de compostos voláteis, no headspace de amostras de mosto de maçã, sidra e fermentados sintéticos com diferentes aminoácidos adicionados separadamente.

Compostos voláteis (mg/L)	Mosto de maçã	Sidra	Mosto sintético inicial	SSM	Aminoácidos avaliados de forma isolada			
					Asp	Asn	Glu	Ser
Etanal	457,73±29,64	1274,52±12,06	124,90 ± 30,81	1964,23 ± 10,60 ^b	552,99 ± 131,42 ^{cd}	343,25 ± 29,12 ^d	690,17 ± 25,63 ^c	3482,77 ± 157,06 ^a
Etanoato de 2-metilpropila	10,56±0,96	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Etanoato de etila	159,38±1,54	980,43±17,43	nd	719,26 ± 7,20 ^b	838,94 ± 53,70 ^a	835,91 ± 30,94 ^a	762,64 ± 7,62 ^b	12,71 ± 0,24 ^c
Butanoato de etila	nd	20,18±0,86	nd	12,92 ± 1,90	13,37 ± 2,06	13,52 ± 2,86	10,99 ± 0,49	nd
Etanoato de butila	22,66±0,17	18,97±0,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Etanoato de 3-metilbutila	27,02±0,32	109,75±3,44	nd	39,31 ± 3,30 ^c	56,92 ± 3,77 ^a	49,57 ± 2,77 ^{ab}	43,19 ± 7,57 ^{bc}	nd
Etanoato de hexila	13,53±0,27	39,71±1,78	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-metil-1-butanol	92,87±2,39	2152,53±7,85	nd	1953,16 ± 19,16	2282,68 ± 313,41	2045,87 ± 88,14	2099,97 ± 81,27	nd
2-hexanol	nd	210,00±3,56	nd	93,40 ± 9,40 ^c	147,32 ± 30,91 ^b	136,73 ± 0,09 ^b	90,46 ± 3,97 ^c	335,48 ± 17,55 ^a
2-heptanona	nd	23,17±0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-octanona	nd	nd	nd	nd	nd	22,17 ± 0,00	nd	nd
1-hexanol	23,55±1,08	nd	10,71 ± 3,26	nd	nd	nd	nd	nd
Octanoato de etila	nd	66,56±2,07	nd	54,40 ± 5,04 ^b	66,14 ± 2,56 ^a	55,55 ± 0,73 ^b	40,55 ± 1,32 ^c	nd
Decanoato de etila	nd	41,15±2,60	nd	66,50 ± 6,05 ^a	58,76 ± 0,73 ^b	53,59 ± 4,18 ^c	28,06 ± 0,44 ^d	nd
2-feniletanol	nd	800,40±5,37	nd	724,07 ± 7,02 ^c	799,38 ± 64,72 ^a	798,26 ± 0,00 ^{ab}	787,41 ± 4,66 ^{ab}	nd
Dodecanoato de etila	52,81±0,66	51,74±0,55	nd	73,85 ± 7,08 ^a	102,64 ± 25,29 ^a	82,32 ± 3,02 ^a	31,41 ± 3,80 ^b	nd
TOTAL	860,11	5789,11	135,60	5701,11	4919,16	4705,70	4584,85	3830,95

Nota: nd = não detectado; diferentes letras na mesma linha representam diferença estatística entre os resultados ($p < 0,05$); dados são médias de três replicatas.

O nível de compostos voláteis formados durante a fermentação com aminoácidos isolados (Tabela 4.4) foi diferente significativamente ($p < 0,05$), o que demonstra o efeito destes compostos sobre o metabolismo dos aromas. Isto também foi reportado por Hernández-Orte *et al.* (2005), ao avaliar o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio total (amônia ou aminoácidos) sobre a formação de compostos voláteis em vinhos. Os resultados demonstraram que a suplementação de nitrogênio interfere na produção de álcoois e ésteres.

No mosto sintético inicial, antes do processo de fermentação, foram identificados apenas dois compostos voláteis, estes compostos deviam estar presentes nas matérias primas utilizadas na formulação.

Os compostos etanal, etanoato de etila e 2-hexanol foram produzidos em todos os mostos sintéticos. Dodecanoato de etila, 2-feniletanol, octanoato de etila, 3-metil-1-butanol e etanoato de 3-metilbutila foram produzidos em todos os mostos sintéticos, com exceção apenas para o mosto com adição de serina como nitrogênio total. Os compostos 1-hexanol, etanoato de 2-metilpropila, etanoato de butila e 2-heptanona não foram identificados nos mostos sintéticos fermentados, e o conteúdo de etanal aumentou em todos os tratamentos. O 1-hexanol foi consumido nas fermentações de maçã e sintética. Com isso, fica evidente que os aminoácidos estão associados com a produção de compostos voláteis em sidras.

Fazendo uma comparação apenas entre os mostos sintéticos (Tabela 4.4), o aspartato apresentou a maior produção de dodecanoato de etila, etanoato de etila, 2-feniletanol, octanoato de etila, etanoato de 3-metilbutila e 3-metil-1-butanol, composto que são relacionados à sensação aromática floral e frutada em fermentados de uva (CIANI; BECO; COMITINI, 2006). O mosto com glutamato produziu, após a fermentação, as menores concentrações de etanal, etanoato de 3-metilbutila, 2-hexanol, octanoato de etila e decanoato de etila, nas amostras em que estes compostos foram detectados.

É possível observar que os aminoácidos que produziram as maiores quantidades de ésteres foram aspartato (1136,77 mg/L), asparagina (1090,47 mg/L) e glutamato (916,84 mg/L). Por esta razão, estes foram os aminoácidos escolhidos para o planejamento experimental *simplex centroid*.

Outro importante aspecto é que a adição de serina produziu baixas concentrações de compostos voláteis (3830,95 mg/L) quando comparada com outros aminoácidos, apresentando apenas etanal, etanoato de etila e 2-hexanol. Isto pode ter ocorrido pelo fato que este aminoácido

somente é assimilável quando existem outras fontes de nitrogênio no meio (amônia, por exemplo).

Com a variação significativa na produção de compostos voláteis após a fermentação é possível perceber que os aminoácidos presentes no mosto exercem influência sobre a produção de aromas durante a fermentação.

Parâmetros de fermentação para o planejamento “simplex centroid”

Os teores totais de ésteres entre os ensaios variaram de 921,24 a 1321,22 mg/L, sendo o ensaio 3 (1321,22 mg/L) com a maior concentração e o ensaio 6 (921,24 mg/L) com a menor. Etanoato de etila (651,95 a 1031,08 mg/L) e dodecanoato de etila (28,13 a 121,06 mg/L) foram os ésteres mais produzidos nestes ensaios (Tabela 4.5). Os compostos que apresentaram maior variação na quantidade detectada, considerando todos os ensaios foram, etanal, hexanoato de etila, octanoato de etila, dodecanoato de etila e 2-hexanol.

Tabela 4.5 Compostos voláteis das diferentes misturas de aminoácidos do planejamento fatorial.

Compostos voláteis	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	p ANOVA
Etanal	625,61±52,82 ^f	716,26±11,20 ^f	713,10±2,96 ^f	944,73±191,92 ^e	1631,23±2,82 ^b	576,40±27,26 ^f	2017,48±2,37 ^a	1343,87±28,86 ^c	1016,76±47,08 ^{de}	1105,61±0,00 ^d	<0,001
Etanoato de etila	898,77±6,09 ^{ab}	951,71±6,90 ^{ab}	870,48±10,40 ^b	1031,08±187,60 ^a	908,01±4,89 ^{ab}	718,14±7,68 ^c	880,41±4,12 ^b	931,38±8,32 ^{ab}	860,33±42,75 ^b	651,95±37,75 ^e	<0,001
Butanoato de etila	nd	nd	nd	10,38±0,44 ^b	nd	9,97±0,01 ^c	10,19±0,30 ^{bc}	10,54±0,11 ^{ab}	10,87±0,02 ^a	nd	<0,001
Etanoato de hexila	nd	9,23±0,04 ^b	199,44±0,00 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<0,001
Etanoato de 3-metil butila	31,64±2,58 ^{bc}	35,32±4,38 ^{bc}	29,90±0,31 ^c	31,53±4,92 ^{bc}	30,83±0,18 ^{bc}	34,38±3,40 ^{bc}	31,25±0,48 ^{bc}	33,44±0,47 ^{bc}	36,85±0,00 ^b	79,21±3,08 ^a	<0,001
Hexanoato de etila	33,93±1,58 ^f	65,51±3,55 ^b	43,84±0,00 ^d	36,28±0,00 ^f	55,93±2,18 ^c	32,92±0,00 ^f	35,41±0,13 ^f	40,01±0,79 ^e	43,09±1,79 ^{de}	136,78±0,00 ^a	<0,001
Octanoato de etila	28,59±0,60 ^e	33,35±0,00 ^{bc}	29,91±0,01 ^{cd}	32,66±0,19 ^{bcd}	28,68±0,24 ^e	30,43±3,25 ^{cd}	30,29±0,24 ^{cd}	30,25±0,03 ^{cd}	35,56±0,67 ^b	43,78±5,50 ^a	<0,001
Decanoato de etila	26,15±1,33 ^{cd}	32,88±0,28 ^b	26,57±0,00 ^{cd}	26,20±1,50 ^{cd}	21,92±0,71 ^d	20,98±6,81 ^d	22,46±0,05 ^d	24,71±1,34 ^d	30,97±0,73 ^{bc}	48,51±4,96 ^a	<0,001
Dodecanoato de etila	28,13±5,21 ^f	nd	121,06±0,00 ^a	109,32±10,01 ^b	102,79±1,56 ^{bc}	74,41±0,00 ^e	85,22±6,96 ^d	98,10±6,25 ^c	107,80±1,70 ^{bc}	nd	<0,001
2-feniletanol	560,13±112,26 ^b	699,86±74,14 ^a	629,22±0,00 ^{ab}	617,21±6,01 ^{ab}	707,85±0,00 ^a	605,15±0,00 ^{ab}	546,21±34,30 ^b	644,09±72,09 ^{ab}	697,10±109,50 ^a	17,71±0,00 ^e	<0,001
1-hexanol	nd	7,56±0,21	7,70±0,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-
3-metil-1-butanol	2073,06±133,97 ^c	2332,38±63,17 ^{bc}	2347,32±0,00 ^{bc}	2718,75±490,28 ^a	2619,58±24,81 ^{ab}	2043,46±0,00 ^c	2273,44±39,46 ^{bc}	2548,04±8,64 ^{ab}	2172,76±56,16 ^c	45,22±0,00 ^d	<0,001
2-hexanol	58,01±1,53 ^{cf}	86,63±2,36 ^{ab}	75,58±0,00 ^{bcd}	82,60±12,61 ^{bc}	65,66±1,12 ^{de}	83,17±11,37 ^{bc}	76,90±2,10 ^{bcd}	70,95±2,10 ^{cd}	96,50±3,10 ^a	51,41±4,15 ^f	<0,001
Hexanona	12,78±2,55 ^d	22,90±4,97 ^c	26,92±0,48 ^{bc}	32,87±3,53 ^a	31,83±0,85 ^{ab}	22,31±3,41 ^c	25,83±0,95 ^c	32,70±0,70 ^a	24,07±0,00 ^c	7,96±0,00 ^d	<0,001
2-octanona	nd	nd	nd	nd	nd	21,69±0,07	nd	21,65±0,04	21,59±0,34	nd	-
∑ ésteres	1047,21	1128,00	1321,22	1277,44	1148,16	921,24	1095,24	1168,44	1125,46	960,23	-
TOTAL	4376,80	4993,61	5121,05	5673,60	6204,31	4273,43	6035,11	5829,74	5154,26	2188,13	-

Nota: nd = não detectado; diferentes letras na mesma linha representam resultados diferentes estatisticamente ($p < 0.05$), os dados são médias de três replicatas.

Os dados de cinética de fermentação (tempo de fermentação, liberação de CO₂, velocidade de fermentação, tempo para atingir velocidade máxima e contagem de células no momento da velocidade máxima) para os ensaios foram semelhantes entre si, exceto para os ensaios onde a asparagina estava em quantidade superior aos outros dois aminoácidos (ensaio 10) ou no ensaio onde ela estava na mesma concentração do glutamato (ensaio 6). Nestes testes a velocidade média de fermentação foi $6,57 \pm 0,60$ g/L.d, enquanto que nos outros oito ensaios a velocidade média foi de $15,83 \pm 1,19$ g/L.d. Estes dados, juntamente com os valores mais baixos de produção de ésteres pelos ensaios 6 e 10, presumem um efeito negativo da asparagina quando em altas concentrações no início da fermentação combinada com os outros dois aminoácidos.

Um modelo matemático usando MSR foi desenvolvido para verificar a influência entre misturas binárias e ternárias de aminoácidos (aspartato, glutamato e asparagina) sobre a produção de ésteres em fermentações sintéticas.

A representação gráfica ternária (Figura 4.1) evidencia que existem duas regiões que maximizam a produção de ésteres. Mas, aplicando estas condições no modelo proposto pela Equação 2, e levando-se em conta os resultados comentados de cinética de fermentação, percebe-se que a combinação de aspartato e glutamato produz uma somatória de ésteres levemente superior quando comparada à condição de 100% de asparagina, e acaba tendo condições de fermentação melhores.

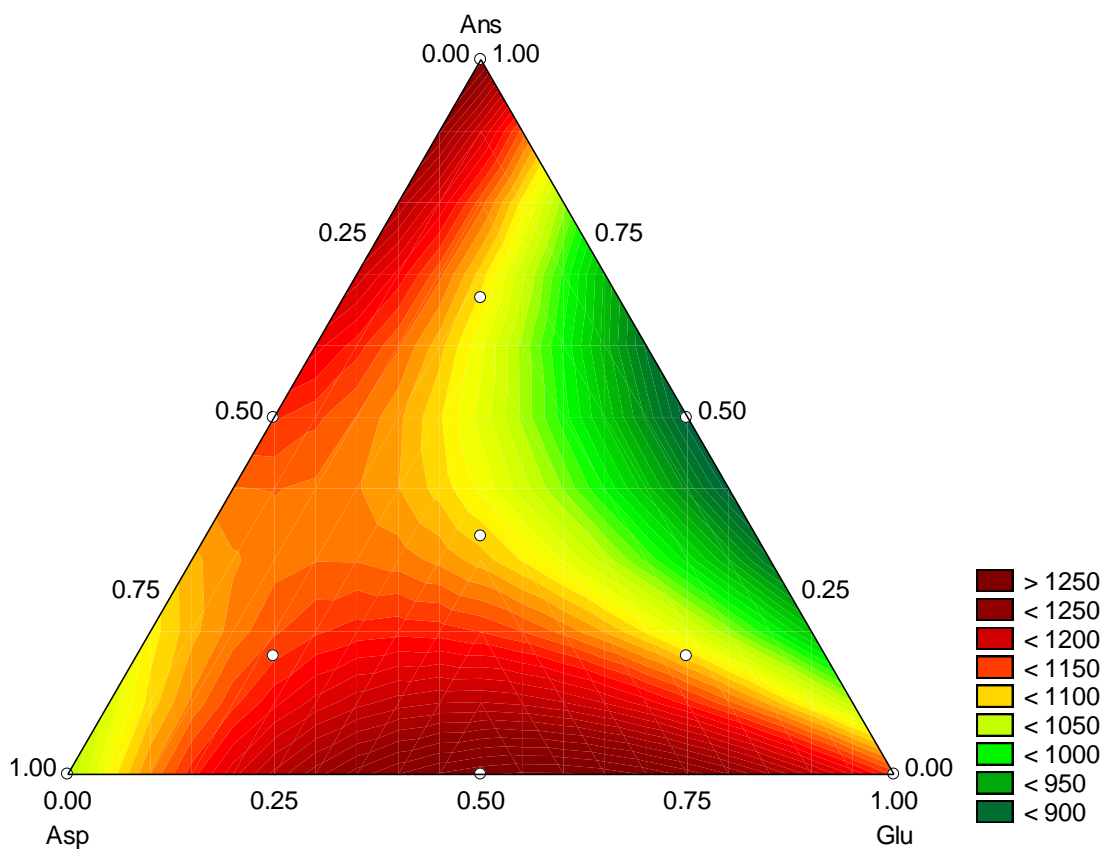


Figura 4.1 Superfície de resposta da somatória de ésteres do planejamento de misturas.

O modelo sugerido foi significativo ($F = 6,46$, $p = 0,03$), e também explica 83,79% da variância dos dados (R^2 ajustado = 0,71). A interação entre aspartato e glutamato (X_1X_2) influenciou positivamente na produção de ésteres, enquanto que a interação entre glutamato e asparagina (X_2X_3) teve influencia negativa (Equação 2).

$$Y = 1039.61 X_1 + 1146.71 X_2 + 1264.30 X_3 + 782.55 X_1X_2 - 1288.89 X_2X_3 \quad (2)$$

Após esta modelagem, um procedimento de otimização simultânea foi realizado com o modelo (função desejada), a fim de verificar esta maximização dos valores de ésteres. As concentrações ótimas sugeridas foram 43,44% de aspartato, 56,67% de glutamato e 0% de asparagina.

É uma prática comum na modelagem realizar a verificação experimental do modelo proposto. Este passo foi realizado em um experimento de fermentação com as melhores condições sugeridas e nos mesmos parâmetros do planejamento fatorial.

Pelo modelo proposto, a quantidade de éster a ser produzida deveria ser próxima de 1292,42 mg/L ($\pm 95\%$ de predição). Pela validação externa, o total de ésteres obtidos foi de 1110,48 mg/L, não apresentando diferença significativa entre os valores preditos ($p = 0,23$). Portanto, o modelo obtido encontra-se adequado para produção de ésteres em sidras.

Validação do modelo e aplicação prática

A aplicação prática do modelo matemático foi feita em um mosto de baixo teor de nitrogênio total ($62,48 \pm 1,74$ mg/L) do cultivar Royal Gala. Este mosto foi complementado com nitrogênio total até um teor de 120,00 mg/L com os teores de aspartato e glutamato propostos pela otimização. Este mosto enriquecido foi submetido à fermentação e posteriormente a análise de compostos voláteis, juntamente com um mosto controle, do mesmo lote. O fermentado sem suplementação de aminoácidos alcançou um total de ésteres de 420,54 mg/L (Tabela 4.6). Em contrapartida, o fermentado suplementado com aspartato e glutamato alcançou uma somatória de 1634,93 mg/L.

Tabela 4.6 Compostos voláteis de sidra de maçã Royal Gala com e sem suplementação de aminoácidos.

Compostos voláteis (mg/L)	Mosto suplementado	Mosto sem suplementação
Etanal	$564,30 \pm 82,5^b$	$1864,82 \pm 114,24^a$
Etanoato de 2-metilpropila	nd	nd
Etanoato de etila	$1405,12 \pm 1,40^a$	$352,22 \pm 23,35^b$
Butanoato de etila	$97,31 \pm 10,60$	nd
Etanoato de etila	nd	nd
Etanoato de hexila	$18,16 \pm 1,05^a$	$13,59 \pm 0,06^b$
Etanoato de 3-metilbutila	$48,01 \pm 0,40$	nd
Hexanoato de etila	$29,69 \pm 0,20$	nd
Octanoato de etila	$27,87 \pm 1,02^a$	$20,03 \pm 0,38^b$
Decanoato de etila	$18,59 \pm 2,84$	$12,06 \pm 0,10$
Dodecanoato de etila	$29,02 \pm 11,56$	$22,64 \pm 1,46$
2-feniletanol	$1112,46 \pm 84,77$	nd
1-hexanol	$36,14 \pm 0,16^b$	$85,35 \pm 8,00^a$
3-metil-1-butanol	$184,29 \pm 2,13$	$179,22 \pm 1,80$
2-hexanol	nd	nd
Hexanona	$22,00 \pm 4,12$	$30,79 \pm 1,12$
2-heptanona	nd	nd
2-octanona	nd	nd
Total de ésteres	1673,77	420,54
Σ de voláteis	3592,96	2580,72

Os resultados demonstram uma aplicação satisfatória, indicando que a suplementação de mostos naturais de maçã com estes dois aminoácidos supre a necessidade de nitrogênio, quando este se encontra em deficiência, evitando fermentação interrompida e valorizando a formação de compostos voláteis com aroma frutado, uma proposta prática viável para a indústria de processamento de sidras.

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o uso do mosto sintético é uma alternativa para estudar a influência dos aminoácidos sobre o aroma da sidra. Foi verificado que os aminoácidos interferem na formação de compostos voláteis da bebida. Os aminoácidos presentes no mosto sintético de forma isolada que produziram concentração de ésteres mais elevada foram aspartato, glutamato e asparagina. O planejamento de misturas resultou em uma superfície de resposta, predizendo uma combinação de aspartato e glutamato como forma de maximizar a produção de ésteres. A aplicação prática do modelo proposto demonstrou uma otimização satisfatória, ao suplementar um mosto de maçã Royal Gala originalmente com baixo teor de aminoácidos. A produção de ésteres no suco enriquecido foi quatro vezes maior do que no suco original.

A suplementação de mostos naturais de maçã mostra-se como opção viável para aplicações de processos industriais quando o mosto apresenta um baixo teor de nitrogênio. Este estudo mostra que a suplementação com os dois aminoácidos, aspartato e glutamato, supre a necessidade de nitrogênio, evitando interrupção da fermentação e favorecendo a formação de compostos voláteis com aroma frutado. Esta alternativa apresenta-se como uma proposta prática viável para a indústria de processamento de sidras na padronização de formação de aromas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível verificar que os aminoácidos aspartato, asparagina e glutamato foram os principais compostos encontrados nos nove mostos de maçã estudados. Foi verificado que sidras produzidas com baixo teor de nitrogênio ou de aminoácido mostraram fermentação interrompida / lenta e ao redor de 50% menor produção de compostos voláteis (independente da cepa de levedura utilizada), principalmente 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) e ésteres. A análise multivariada sugeriu que aspartato, asparagina, glutamato e alanina foram os compostos que mais diferenciaram entre as cepas na produção de álcoois superiores e ésteres etílicos.

Foi possível perceber que existe diferença nos conteúdos de aminoácidos entre diferentes cultivares de maçã. Estas diferenças não se limitam a apenas um aminoácido, mas sim à combinação entre eles, sendo que os aminoácidos majoritários em todas as amostras analisadas foram aspartato, asparagina e glutamato. É possível usar esta informação sobre os aminoácidos disponíveis na maçã para procedimentos de correção de mosto ou suco, favorecendo a qualidade da sidra assim como os aspectos nutricionais dos sucos.

Existem também diferenças no conteúdo de aminoácidos em diferentes estádios de maturação. Aspartato, asparagina, serina e metionina tiveram uma tendência de evolução semelhante durante o desenvolvimento da maturação para os três cultivares avaliados.

Os aminoácidos serina, asparagina, glutamato, NH_3 , treonina, alanina, metionina e lisina, de forma geral, foram consumidos em todas as amostras fermentadas.

Também foi verificado que o uso do mosto sintético é uma alternativa viável para estudar a influência dos aminoácidos sobre o aroma da sidra.

Este estudo mostrou que a suplementação com os dois aminoácidos, aspartato e glutamato, supre a necessidade de nitrogênio da levedura *S. cerevisiae*, apresentando-se como uma proposta prática viável para a indústria de processamento de sidras na padronização de formação de aromas. Estas informações podem ser utilizadas para padronizar a composição inicial do mosto de maçã pelas indústrias de processamento, a fim de obter produtos mais aromáticos e com qualidade superior à que existe atualmente.

Desta forma, este trabalho traz contribuições referentes à influência dos aminoácidos na formação de compostos voláteis em sidras. Poderá, assim, influenciar o setor produtivo,

melhorando a qualidade da sidra produzida, satisfazendo os consumidores, que estão cada vez mais exigentes.

Como perspectivas futuras é possível pensar em, através de uma análise mais profunda da via de Ehrlich, usar aminoácidos que conduzam à formação de um composto volátil especificamente. Também se deve levar em conta a importância de se realizar análise sensorial dos produtos finais, como forma de valorizar os resultados aqui encontrados.

REFERÊNCIAS

- ABPM. Associação Brasileira de Produtores de Maçã. **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/>> Acesso em: 10 abr, 2014.
- ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3187–3195, 1996.
- ALBERTI, A.; VIEIRA, R. G.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple Wine Processing with Different Nitrogen Contents. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 54, n. 3, p. 551 – 558, 2011.
- ALCAIDE-HIDALGO, J.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; POLO, M. C. Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. **Food Chemistry**, v. 103, p. 572–581, 2007.
- ALCARDE, A. R.; MONTEIRO, B. M. S.; BELLUCO, A. E. S. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 35, p. 1612-1618, 2012.
- ANCÍN-AZPILICUETA, C.; TORREA GOÑI, D.; GARDEN-CERDAN, T. Effects of the clarification of must in the development of the alcoholic fermentation. In S. G. Pandalai (Ed.) **Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, p. 231 – 249, 2001.
- ANTÓN, M. J.; SUÁREZ VALLES, B.; GARCÍA HEVIA, A.; PICINELLI LOBO, A. Aromatic Profile of Ciders by Chemical Quantitative, Gas Chromatography-Olfactometry, and Sensory Analysis. **Journal of Food Science**, v. 79, p. S92-S99, 2014
- ARDÖ, Y. Flavour formation by amino acid catabolism. **Biotechnology Advanced**, v. 24, p. 238–242, 2006.
- ARIAS-GIL, M.; GARDE-CERDAN, T.; ANCIN-AZPILICUETA, C. Influence of addition of ammonia and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1312–1318, 2007.
- BARBOSA, C.; MENDES-FAIA, A.; MENDES-FERREIRA, A. The nitrogen source impacts major volatile compounds release by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 87-93, 2012.
- BARON, A.; BOHUON, G.; DRILLEAU, J. F. Remarques sur l'indice formol des concentrés de jus de pomme. **Annual Falsification l'Expertise Chimique**, v. 70, n. 749, p. 19-26, 1977.
- BELTRAN, G.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation

kinetics and nitrogen consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 996–1002, 2005.

BELTRAN, G.; ROZES, N.; MAS JOSÉ, A.; M. GUILLAMÓN, J. M. Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 809–815, 2007.

BELY, M.; SALMON, J. M.; BARRE, P. Assimilable nitrogen addition and hexose transport activity during enological fermentations. **Journal Institute of Brewing**, v. 100, p. 279-282, 1994.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41 p. 319-324, 1990.

BLANCO, D.; GUTIÉRREZ, M. D.; MANGAS, J. J.; NOVAL, A. Determination of sugars and alcohols in apple juice and cider by high performance liquid chromatography. **Chromatographia**. v. 25, n. 701-706, 1988.

BISSON, L.F.; BUTZKE, C. E. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, p. 168–177, 2000.

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

BRASIL. **Normas de identidade e qualidade da sidra**. Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009. Diário Oficial da União, Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Departamento de Comercialização e Abastecimento Agrícola e Pecuário. **Informativo** 54. 2013.

CAMARASA, C.; GRIVET, J. P.; DEQUIN, S. Investigation by ¹³CNMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways of succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. **Microbiology**, v. 149, p. 2669–2678, 2003.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 239–245, 2006.

COLE, V. C.; NOBLE, A. C. Flavor chemistry and assessment. In: Lea AGH, Piggot JR (eds) **Fermented beverage production**, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp 361–381, 1995.

COLOMBIÉ, S.; LATRILLE, E.; SABLAYROLLES, J. M. Online estimation of assimilable nitrogen by electrical conductivity measurement during alcoholic fermentation in enological conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 229-235, 2007.

CORDENTE, A. G.; CORDERO-BUESO, G.; PRETORIUS, I. S.; CURTIN, C. D. Novel wine yeast with mutations in YAP1 that produce less acetic acid during fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 62 – 73, 2012.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensor y profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 4: 925 – 932, 2010.

CSOMA, H.; SIPICZKI, M. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 328–336, 2008.

CRUZ, S. H.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on the yeast growth and fermentation. **Journal Institute of Brewing**, v. 108, p. 54-61, 2002.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214–219, 1980.

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

DRILLEAU, J. F. Pommes et cidres, matières premières du calvados. In: CANTAGREL, R. **Elaboration et connaissance des spiritueux**. Cognac: BMCE, p. 193-200, 1993.

FALLON, A.; BOOTH, R. F. G. & BELL, L. D.. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Applications of HPLC in Biochemistry**. Vol. 17. Amsterdam: Elsevier, 1987. 338 p. (3a. impressão,1993).

FAN, W.; XU, Y.; HAN, Y. Quantification of volatile compounds in chinese ciders by stir bar sorptive extraction (SBSE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS). **Journal Institute of Brewing**, v. 117, p. 61–66, 2011.

GAMERO, A.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; QUEROL, A.; FERREIRA, V. Effect of aromatic precursor addition to wine fermentations carried out with different *Saccharomyces* species and their hybrids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 33–44, 2011.

GAMERO, A.; TRONCHONI, J.; QUEROL, A.; BELLOCH, C. Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces* species and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1405-1414, 2013.

GARAI-IBABE, G.; IRASTORZA, A.; DUEÑAS, M. T.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; MORENO-ARRIBAS, V. M. Evolution of amino acids and biogenic amines in natural ciders as a

function of the year and the manufacture steps. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 375-381, 2013.

GARDEN-CERDAN, T.; ANCIN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 15–25, 2006.

GARDEN-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. **Lebensmittel – Wissenschaft und -Technologie**, v. 41, n. 3, p. 501-510, 2008.

GATFIELD, I. L. Enzymatic and microbial generation of flavor. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, p. 5-14, 1995.

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

GOMÉZ-ARIZA, J. L.; VILLEGAS-PORTERO, M. J.; BERNAL-DAZA, V. Characterization and analysis of amino acids in orange juice by HPLC – MS/MS for authenticity assessment. **Analytica Chimica Acta**, v. 540, p. 221 – 230, 2005.

GOÑI, D. T.; AZPILICUETA, C. A. Use of nitrogen compounds in spontaneous and inoculated wine fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4018-4024, 1999.

GUEDES, C. M.; PINTO, A. B.; MOREIRA, R. F. A.; DE MARIA, C. A. B. Study the aroma compounds of rose apple (*Syzygium jambos* Alston) fruit from Brazil. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 460-464, 2004.

GUTIÉRREZ, A.; BELTRAN, G.; WARRINGER, J.; GUILLAMON, J. M. Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. **Plos One**, v. 8, 2013.

HAIDER, W.; BARILLIER, D.; HAYAT, A.; GAILLARD, J. L.; LEDAUPHIN, J. Rapid quantification and comparison of major volatile compounds of ciders from France (Normandy and Brittany) using microextraction by packed sorbent (MEPS). **Analytical Methods**, v. 6, p. 1364-1376, 2014.

HASHIMOTO, K.; FUKUSHIMA, T.; SHIMIZU, E.; OKADA, S. I.; KOMATSU, N.; OKAMURA, N.; KOIKE, K.; KOIZUMI, H.; KUMAKIRI, C.; IMAI, K.; IYO, M. Possible role of D-serine in the pathophysiology of Alzheimer's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, p. 385–388, 2004.

HAZELWOOD, L. A.; DARAN J. M.; VAN MARIS, A. J.; PRONK, J. T.; DICKINSON, J. R. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Applied Environment of Microbiology**, v. 74, p. 2259–2266, 2008.

HAWKINS, R. A. The blood–brain barrier and glutamate. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, p. 867–874, 2009.

HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. In: **Wine Microbiology and Biotechnology**, G. H. Fleet, Ed., pp. 77–164, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 1993.

HERFORTH, A.W. An apple a day can functional foods keep the doctor away. **Nutritional Review**, v. 58, p. 1-10, 2000.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; IBARZ, M. J.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. **Food Chemistry**, v. 89, p. 163-174, 2005.

HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Volatile compounds in cider: inoculation time and fermentation temperature effects. **Journal Institute of Brewing**, v. 112, p. 210-214, 2006.

HOOI, M. Y.; TRUSCOTT, R. J. Racemisation and human cataract. D-Ser, D-Asp/Asn and D-Thr are higher in the lifelong proteins of cataract lenses than in age-matched normal lenses. **Age** (Dordrecht, Neth), v. 33, p. 131-141, 2010.

HUANG, F.; DU, W. Solution structure of Hyp10Pro variant of conomarphin, a cysteine-free and D-amino-acid containing conopeptide. **Toxicol**, v. 54, p. 153–160, 2009.

HUBER, J. D. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural Review**, v. 5, p. 169-219, 1983.

IAL. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. In: **IAL**. Normas Analíticas. 3. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INGLEDEW, W. M.; KUNKEE, R. E. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, p. 65-76, 1985.

JANECZKO, M. J.; STOLL, B.; CHANG, X.; GUAN, X.; BURRIN, D. G. Extensive gut metabolism limits the intestinal absorption of excessive supplemental dietary glutamate loads in infant pigs. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2384–2390, 2007.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 523 – 528, 2003.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; LANÇAS, M. F. Identificação de compostos voláteis de maçãs (*Malus domestica*) cultivar Fuji, por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, Campinas, maio-ago, 2000.

- JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, p. 75-83, 1995.
- JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, p. 63–69, 2003.
- JULIEN, A.; ROUSTAN, J.-L.; DULAU, L.; SABLAYROLLES, J. M. Comparison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts: Technological Consequences **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n. 3, p. 215-222, 2000.
- KAMMERER, J.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Impact of saccharides and amino acids on the interaction of apple polyphenols with ion exchange and adsorbent resins. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 230–239, 2010.
- KELKAR, S.; DOLAN, K. Modeling the effects of initial nitrogen content and temperature on fermentation kinetics of hard cider. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 588–596, 2012.
- KIM, P. M.; DUAN, X.; HUANG, A. S.; LIU, C. Y.; MING, G. L.; SONG, H.; SNYDER, S. H. Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 3175–3179, 2010.
- KUNEMAN, D. W.; BRADDOCK, J. K.; MCCHESENEY, L. L. HPLC profile of amino acids in fruits juices as their (1-fluoro-2,4-dinitrophenyl)-5-l-alanine amide derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 6–9, 1988.
- KUNKEE, R. E. Relationship between nitrogen content of must and sluggish fermentation. In J. Rants (Ed.). International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. Davis, USA: **American Society for Enology and Viticulture**, p. 148 – 155, 1991.
- LABRIE, V.; FUKUMURA, R.; RASTOGI, A.; FICK, L. J.; WANG, W.; BOUTROS, P. C.; KENNEDY, J. L.; SEMERALUL, M. O.; LEE, F. H.; BAKER, G. B.; BELSHAM, D. D.; BARGER, S. W.; GONDO, Y.; WONG, A. H. C.; RODER, J. C. Serine racemase is associated with schizophrenia susceptibility in humans and in a mouse model. **Human Molecular Genetics**, v. 18, p. 3227–3243, 2009.
- LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Yeasts and its importance to wine aroma - a review. **South Africa Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97–129, 2000.
- LARGE, P. J. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. **Yeast**, v. 2, p. 1-34, 1986.
- LEA, A. Cider-making: An overview. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 14-17, 2004.
- LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J. F. Cidermaking. In: LEA, A. G. H. **Fermented Beverage Production**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 2003.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, n. 11, p. 641-649, 1981.

LEI, H.; ZHENG, L.; WANG, C.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 76–83, 2013.

LEQUÉRÉ, J. M. Effervescence naturelle et gazéification. **Pomme**, v. 25, p. 15-17, 1992.

LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F. Microbiology and technology of cider. **Review of Enologues**, v. 88, p. 17-20, 1998.

LIMA, L. L. A.; SCHULER, A.; GUERRA, N. B.; PEREIRA, G.; LIMA, T. L. A.; ROCHA, H. Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 33, p. 1186-1189, 2010.

LLORENTE, D. D.; ABRODO, P. A.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; DE LE FUENTE, E. D.; ALONSO, J. J. M.; ÁLVAREZ, M. D. G.; GOMIS, D. B. A new analytical method to volatile compounds in cider apples: Application to evaluate the starch index. **Food Bioprocess and Technology**, v. 6, p. 2447-2454, 2012.

MA, M.; LUO, X.; CHEN, B.; SU, S.; YAO, S. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1103, p. 170-176, 2006.

MACCHIA, G.; TOPO, E.; MANGANO, N.; D'ANIELLO, E.; BONI, R. DL - Aspartic acid administration improves semen quality in rabbit bucks. **Animal Reproducing Science**, 118, p. 337–343, 2010.

MADRERA, R. R.; HAVIA, A. G.; GARCÍA, N. P.; VALLES, B. S. Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. **Lebensmittel – Wissenschaft und -Technologie**, v. 41, p. 2064 – 2069, 2008.

MADRERA, R. R.; GARCÍA, N. P.; HEVIA, A. G.; SUAREZ VALLES, B. Application of purge and trap extraction and gas chromatography for determination of minor esters in cider. **Journal of Chromatography**, v. 1069, p. 245–251, 2005.

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

MADRERA, R. R.; MANGAS, J. J. A. Distribution of the principal minor volatiles during cider distillation in “alquitara”. **Acta Aliment Hung**, v. 40, p. 262 – 269, 2011.

MANGAS, J. J.; MORENO, J.; PICINELLI, A.; BLANCO, D. Characterization of Cider Apple Fruits According to Their Degree of Ripening. A Chemometric Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4174-4178, 1998.

MANGINOT, C.; ROUSTAN, J. L.; SABLAYROLLES, J. M. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 23 n. 7-8, p. 511-517, 1998.

MARCHAND L., S. MURPHY, J. HANKIN, L. WILKENS, L. KOLONEL. Intake of flavonoids and lung cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 92, p. 154-160, 2000.

MATTHEIS, J. P.; BUCHANAN, D. A.; FELLMAN, J. K. Volatile compounds emitted by 'Gala' Apples following dynamic atmosphere storage. **Journal American Society of Horticultural Science**, v. 123, p. 426-432, 1998.

MATSUDA S.; MATSUZAWA D.; NAKAZAWA K.; SUTOH C.; OHTSUKA H.; ISHII D.; TOMIZAWA H.; IYO M.; SHIMIZU E. D-serine enhances extinction of auditory cued fear conditioning via ERK1/2 phosphorylation in mice. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, p. 895-902, 2010.

MCCONATHY, J.; GOODMAN, M. M. Non-natural amino acids for tumor imaging using positron emission tomography and single photon emission computed tomography. **Cancer Metastasis Review**, v. 27, p. 555-573, 2008.

MEHINAGIC, E.; LLE ROYER, G.; SYMONEAUX, R.; JOURJON, F. A. A.; PROST, C. Characterization of Odor-Active Volatiles in Apples: Influence of Cultivars and Maturity Stage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2678-2687, 2006.

MOTHET, J.P.; ROUAUD, E.; SINET, P. M.; POTIER, B.; JOUVENCEAU, A.; DUTAR, P.; VIDEAU, C.; EPELBAUM, J.; BILLARD, J. M. A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. **Aging Cell**, v. 5, p. 267-274, 2006.

MUTH-SELBACH, U.; DYBEK, E.; KOLLOSCH, K.; STEGMANN, J. U.; HOLTHUSEN, H.; LIPFERT, P.; ZEILHOFER, H. U. The spinal antinociceptive effect of nocistatin in neuropathic rats is blocked by D-serine. **Anesthesiology**, v. 101, p. 753-758, 2004.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; DRILLEAU, J. F.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 02, p. 274-280, 2003.

NOGUEIRA, A.; LEQUÉRÉ, J. M.; BULDIN, R. Oxygène et stabilité des cidres. **Review Pomme à cidre**, v. 5, p. 16 - 17, 2003.

NOGUEIRA, A.; LEQUÉRÉ, J. M.; GESTIN, P.; MICHEL, A.; WOSIACKI, G.; DRILLEAU, J. F. Slow Fermentation in French Cider Processing due to Partial Biomass Reduction. **Journal Institute of Brewing**, v. 2, p. 102 - 110, 2008.

- NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas Alcoólicas - Ciência e Tecnologia**, 1 ed. São Paulo: Blücher, v. 1, p. 113-142, 2012.
- OUGH, C. S.; HUANG, Z.; STEVENS, D. Amino acid uptake by four commercial yeast at two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 42, p. 26-40, 1991.
- PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Industrial fitness analysis of six apple cultivars, considering their physico-chemical evaluation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 1336-1343, 2004.
- PÉREZ-ZÚÑIGA, F. J.; ABAD, F. B.; CARTAGENA, L. G. Residual proteins and amino nitrogen in fermented wine and beer: must variety and yeast interactions. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 205, p. 165-169, 1997.
- PENG, B.; YUE, T.; YUAN, Y. Analysis of key aroma components in cider from Shaanxi (China) *Fuji* apple. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 610–615, 2009.
- PIETERS, R.; HUNGER, S. P.; BOOS, J.; RIZZARI, C.; SILVERMAN, L.; BARUCHEL, A.; GOEKBUGET, N.; SCHRAPP, M.; PUI, C. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 15, p. 238 – 249, 2011.
- 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.
- PINHEIRO, D. M.; PASTORE, G. M. Produção biotecnológica de compostos de aromas. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**, São Paulo: Livraria Varela, p. 195-206, 2003.
- PLOTTO, A.; MCDANIEL, R. M.; MATTHEIS, J. P. Characterisation of Gala apple aroma and flavor: differences between controlled atmosphere and air storage. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 124, p. 416-423, 1999.
- PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. **Yeast**. v. 16, p. 675–729. 2000.
- RADLER, F. Yeasts—metabolism of organic acids. In: **Wine Microbiology and Biotechnology**, G. H. Fleet, Ed., pp. 165–182, Harwood Academic Publishers, Singapore, 1993.
- RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. **Developments in Food Science**, v. 37, p. 1659–1694, 1995.

REEDS, P. J. ; BURRIN, D. G. ; STOLL, B. ; JAHOOOR, F. Intestinal glutamate metabolism. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 978, 2000.

RIBEREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; LONVAUD, B. D. A. **Handbook of Enology**, v. 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition. John Wiley & Sons Ltd, England, 1998.

RIBEREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology**. The chemistry of wine and stabilization and treatments. John Wiley & Sons, v.2, 2006.

RITA, R.; ZANDA, K.; DAINA, K.; DALIJA, S. Compositions of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast 546 concentration. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1709-1716, 2011.

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

RODRIGUEZ, R. S. J.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M.; SÁNCHEZ-MATA, M. C. Simultaneous determination of vitamin B₁ and B₂ in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. **Journal of Cereal Science**, v. 55, p. 293-299, 2012.

RODWELL, V. W. Amino acids. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W.. **Harper's biochemistry**. 24 ed.. Stamford: Appleton & Lange, p. 868, 1996.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **Institucional Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 181 – 188, 2003.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86; p. 169–180; 2003.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied Environment Microbiology*, v. 74, p. 454-461, 2008.

SALMON, J. M.; FORNAIRON, C.; BARRE, P. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.2, p.154-163. 1998.

SANCHO, M. F.; RAO, M. A.; DOWNING, D. L. Infinite dilution activity coefficients of apple juice aroma compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 34, p. 145-158, 1997.

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. **Journal of Food Science**, *in press*, 2015.

SHAO, X.; TU, K.; TU, S.; SU, J.; ZHAO, Y. Effects of Heat Treatment on Wound Healing in Gala and Red Fuji Apple Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 4303-4309, 2010.

STYGER, G.; PRIOR, B.; BAUER, F. F. Wine flavor and aroma. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1145–1159, 2011.

SUÁREZ VALLES, B.; PALACIOS, N.; RODRÍGUEZ, R.; PICINELLI, A. Influence of yeast strain and aging time on free amino acid changes in sparkling ciders. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6408–6413, 2005.

SUAREZ VALLES, B.; PEDRIÑANA, R. P.; TASCÓN, N. F.; SIMÓN, A. Q.; MADRERA, R. R. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. **Food Microbiology**, v. 24, p. 25–31, 2007.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, p. 139–173, 2005.

TANNER, H.; BRUNNER, H. R. **Getränke Analytik - Untersuchungsmethode für die Labor- und Betriebspraxis**. Wädenswill: Verlag Helles, 1985.

VALLES, B. S.; GARCÍA, N. P.; MADRERA, R. R.; LOBO, A. P. Influence of yeast strain and aging time on free amino acid changes in sparkling ciders. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6408–6413, 2005.

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

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, China, v. 33, p. 192-196, 2006.

XU, Y.; FAN, W.; QIAN, M. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oregon, v. 55, p. 3051 – 3057, 2007.

YIP, W. K.; YANG, S. F. Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. **Plant Physiology**, v. 188, p. 473, 1988.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and Biotechnology**. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1. ed, 1998.

WIPF, D.; LUDEWIG, U.; TEGEDER, M.; RENTSCH, D.; KOCH, W.; FROMMER, W. B. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. **Biochemical Science**, v. 27, p. 139–147, 2002.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apples cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v.37, n.1, p.9-22. 2008.

WOSIACKI, G. Apple varieties growing in subtropical areas: the situation in Paraná - Brazil. **Fruit Processing**, v. 5, p. 177-182, 2001.

WOSIACKI, G.; KAMICOGA, A. T. M.; NEVES, J. F. Características do suco clarificado de maçãs. **Alimentos e Tecnologia**, São Paulo, v. 8, n. 37, p. 76-79, 1991.

WU,

YE, M.; YUE, T.; YUAN, Y. Changes in the profile of volatile compounds and amino acids during cider fermentation using dessert variety of apples. **European Food Research and Technology**, v. 239, p. 67 – 77, 2014.

YOUNG, H.; GILBERT, J. M.; MURRAY, S. H.; BALL, R. D. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 71, p. 329-336, 1996.

YOUNG, H.; ROSSITER, K.; WANG, M.; MILLER, M. Characterization of Royal Gala Apple Aroma Using Electronic Nose Technologys Potential Maturity Indicator. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 47, p. 5173–5177, 1999.

YULIANTI, F.; REITMEIER, C. A.; BOYLSTON, T. D. Consumer sensory evaluation and flavor analyses of pasteurized and irradiated apple cider with potassium sorbate. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 193-197, 2004.

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

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

ANEXO I

**ARTIGO ACEITO NA REVISTA “*JOURNAL OF FOOD SCIENCE*”
(CAPÍTULO 2)**

Apple Aminoacid Profile and Yeast Strains in the Formation of Fusel Alcohols and Esters in Cider Production

C: Food chemistry

Caroline Mongruel Eleutério dos Santos, Giovana de Arruda Moura Pietrowski, Cíntia Maia Braga, Márcio José Rossi, Jorge Ninow, Tãmisa Pires Machado dos Santos, Gilvan Wosiacki, Regina Maria Matos Jorge, and Alessandro Nogueira

Abstract: The amino acid profile in dessert apple must and its effect on the synthesis of fusel alcohols and esters in cider were established by instrumental analysis. The amino acid profile was performed in nine apple musts. Two apple musts with high (>150 mg/L) and low (<75 mg/L) nitrogen content, and four enological yeast strains, were used in cider fermentation. The aspartic acid, asparagine and glutamic acid amino acids were the majority in all the apple juices, representing 57.10% to 81.95%. These three amino acids provided a high consumption (>90%) during fermentation in all the ciders. Principal component analysis (PCA) explained 81.42% of data variability and the separation of three groups for the analyzed samples was verified. The ciders manufactured with low nitrogen content showed sluggish fermentation

ANEXO II

**RESUMO APRESENTADO NO “*16th WORLD CONGRESSO OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*”
(CAPÍTULO 3)**



Certificate of Appreciation

16th IUFOST | World Congress of Food Science and Technology

We certify that the paper entitled
Development, optimization and validation of artificial apple must.

authored by

Caroline Mongruel Eleutério dos Santos; Aline Alberti; Luciana Igarashi Mafra; Gilvan Wosiacki; Alessandro Nogueira; Regina Maria Matos Jorge

was presented in the Poster Session at the **16th World Congress of Food Science and Technology** :
"Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology", held at Foz do Iguçu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.

Glaucia Maria Pastore
Chair

Delia B. Rodriguez-Amaya
Scientific Committee Chair



c08d.d17e.6784.60ca.662c.f1fb.4d8e.c721