

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

**MARIA LUÍSA CERRI**

**PRODUÇÃO DE FERMENTADO ALCÓOLICO DE MAÇÃ ADICIONADO DO  
COGUMELO *Cordyceps militaris*: CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO,  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE**

**PONTA GROSSA  
2025**

**MARIA LUÍSA CERRI**

**PRODUÇÃO DE FERMENTADO ALCÓOLICO DE MAÇÃ ADICIONADO DO  
COGUMELO *Cordyceps militaris*: CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO,  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, POTENCIAL ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciência e Tecnologia em Alimentos da  
Universidade Estadual de Ponta Grossa como  
requisito para a obtenção do título de Doutora em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

**PONTA GROSSA**

**2025**

C417 Cerri, Maria Luísa

Produção de Fermentado Alcolóico de Maçã Adicionado do Cogumelo *Cordyceps militaris*: Cinética de fermentação, composição química, potencial antioxidante e toxicidade / Maria Luísa Cerri. Ponta Grossa, 2025.  
120 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira.

1. Sidra - produção. 2. Cogumelo - *Cordyceps militaris*. 3. Fermentação alcóolica. 4. Extração hidroalcóolica. 5. Atividade antioxidante. I. Nogueira, Alessandro. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. III.T.

CDD: 663.2

## TERMO DE APROVAÇÃO

**MARIA LUÍSA CERRI**

**“Produção de fermentado alcoólico de maçã adicionado do cogumelo *Cordiceps militaris*: cinética de fermentação, composição química, potencial antioxidante e toxicidade”.**

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor(a) no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: **Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG-PR**

**Prof. Dr. Alessandro Nogueira**  
UEPG-PR - Presidente

Documento assinado digitalmente  
 **ALESSANDRO NOGUEIRA**  
Data: 01/08/2025 15:48:19-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
 **ALESSANDRA CRISTINE NOVAK SYDNEY**  
Data: 18/08/2025 11:50:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Alessandra Cristine Novak  
Sydney**  
UTFPR-PR - Membro Titular Externo

Documento assinado digitalmente  
 **ALINE COQUEIRO**  
Data: 18/08/2025 22:28:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Aline Coqueiro**  
UTFPR-PR - Membro Titular Externo

Documento assinado digitalmente  
 **ALINE ALBERTI**  
Data: 01/08/2025 16:09:54-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Aline Alberti**  
UEPG-PR - Membro Titular Interno

Documento assinado digitalmente  
 **RENATA DINNIES SANTOS SALEM**  
Data: 04/08/2025 07:42:12-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Renata Dinnies Santos Salem**  
UEPG-PR - Membro Titular Interno

Ponta Grossa, 01 de agosto de 2025.

Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma apoiam a  
educação pública e reconhecem seu valor para um país melhor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Maria de Lourdes Massucato Cerri e Luís Fernando Cerri, por sempre acreditarem na educação como a melhor forma de mudar o mundo, pela paciência nos anos da minha formação e por entenderem que viver de pós-graduação como única dedicação significa demorar um pouco mais para ter estabilidade, obrigada pelo investimento de risco e espero que ele traga retornos. Agradeço à minha irmã, Ana Cecília Cerri por ter se tornado uma companheira que cresceu comigo em todos os momentos de dificuldade, juntas somos mais fortes.

Agradeço ao meu professor Alessandro Nogueira, por todos os ensinamentos, oportunidades e conversas. Quando entrei no programa já tinha ciência de todas as pessoas que tinham sido orientadas por ele e que já eram grandes pesquisadores, empreendedores e reconhecidos profissionais, agradeço imensamente pela oportunidade.

Agradeço aos professores: Aline Alberti, Eduardo Bittencourt Sydney, Flávio Beltrami, Alessandra Novak Sydney e Aline Coqueiro, pela ajuda em diversas partes da minha caminhada, cada um de sua forma única me ensinou coisas de valores inestimáveis e serei eternamente grata pelo tempo dedicado a mim e à minha pesquisa.

Agradeço a todos os amigos de laboratório, pelo nosso percurso juntos, nas dificuldades e nas comemorações, é só na rotina diária da pesquisa que nós sabemos o quão desafiador é. Com vocês o caminho se tornou um pouco mais fácil. Obrigada. A todos que fazem a ciência no Brasil funcionar, meu mais profundo agradecimento! Desde os técnicos dos laboratórios, os técnicos administrativos, os seguranças e todo o pessoal da limpeza, não seria possível realizar nenhuma pesquisa sem vocês.

Por fim, agradeço à Fundação Araucária e a CAPES pelo financiamento da minha bolsa e dos materiais para a realização desta pesquisa.

“The heat of autumn is different from the heat of summer. One ripens apples,  
the other turns them to cider.”  
(Hirshfield, 2006)

## RESUMO

A sidra, bebida alcoólica fermentada de maçãs, tem seu perfil sensorial definido principalmente por variedades e processamento. No Brasil, seu caráter suave e pouco complexo resulta do uso predominante de maçãs de mesa (como Gala e Fuji). Este estudo propõe a incorporação do fungo medicinal *Cordyceps militaris*, que possui compostos bioativos com propriedades funcionais, para aprimorar atributos sensoriais e funcionais da sidra nacional. A metodologia dividiu-se em duas etapas. Primeiramente, caracterizou-se o cogumelo (umidade, cinzas, proteínas, lipídeos) e otimizou-se a extração de bioativos via delineamento Box-Behnken (15 experimentos), avaliando fenóis totais, atividade antioxidante (FRAP, DPPH, ABTS), cordicepina e adenosina. A extração otimizada empregou solução hidroalcoólica 15%, amplitude ultrassônica de 80% e razão soluto:solvente 30:1, com toxicidade testada em *Artemia salina*. Posteriormente, conduziram-se fermentações em frascos de 250 mL (200 mL útil, 20°C ± 2, 15 dias) com quatro grupos: controle (C), cogumelo seco (COG), extrato otimizado (EXT) e meio líquido fúngico (ML). Monitorou-se diariamente viabilidade celular (câmara de Neubauer/azul de metileno), pH, cor e perda de CO<sub>2</sub>. Adições tardias (após o 12º dia: COGAFT, EXTAFIT) também foram avaliadas, com análises pós-fermentação de fenóis, ácidos orgânicos, voláteis e açúcares. Os resultados revelaram que o modelo de extração otimizado foi válido para fenóis totais ( $r = 0.98$ ), FRAP ( $r = 0.94$ ) e ABTS ( $r = 0.97$ ), elevando esses parâmetros em 147%, 182% e 89%, respectivamente. O extrato mostrou-se atóxico ( $DL_{50} = 1379 \pm 504 \mu\text{L/mL}$ ). Nas fermentações, o grupo COG aumentou a produção de CO<sub>2</sub>, fenóis totais, ácido clorogênico e ácidos orgânicos, mas reduziu aromas e exibiu leve toxicidade. O EXT foi atóxico, com maior etanol e menor CO<sub>2</sub>. Adições tardias prolongaram a fermentação, mantendo atoxicidade e elevando ácido málico e açúcar residual (~1%), sendo que COGAFT incrementou fenóis, ácidos orgânicos e etanol, enquanto EXTAFIT superou o controle em teores fenólicos. Microscopia eletrônica confirmou a ação do cogumelo cominuído como suporte para *Saccharomyces cerevisiae*. Conclui-se que *C. militaris* agrega funcionalidade às sidras, embora teores elevados de ácidos orgânicos demandem ajustes sensoriais.

**Palavras-chave:** sidra, cogumelo, fermentação alcoólica, extração hidroalcoólica, atividade antioxidante, toxicidade, ácidos orgânicos.

## ABSTRACT

Cider, an alcoholic beverage fermented from apples, has its sensory profile defined primarily by varieties and processing. In Brazil, its mild and low-complexity character results from the predominant use of table apples (such as Gala and Fuji). This study proposes incorporating the medicinal fungus *Cordyceps militaris*—which contains bioactive compounds with functional properties—to enhance sensory and functional attributes of national cider. The methodology comprised two stages. First, the mushroom was characterized (moisture, ash, proteins, lipids) and bioactive extraction was optimized via Box-Behnken design (15 experiments), evaluating total phenols, antioxidant activity (FRAP, DPPH, ABTS), cordycepin, and adenosine. Optimal extraction employed a 15% hydroalcoholic solution, 80% ultrasonic amplitude, and 30:1 solute:solvent ratio, with toxicity tested on *Artemia salina*. Subsequently, fermentations were conducted in 250 mL flasks (200 mL working volume, 20°C ± 2, 15 days) with four groups: control (C), dried mushroom (COG), optimized extract (EXT), and fungal liquid medium (ML). Daily monitoring included cell viability (Neubauer chamber/methylene blue), pH, color, and CO<sub>2</sub> loss. Late additions (after day 12: COGAFT, EXTAFT) were also evaluated, with post-fermentation analyses of phenols, organic acids, volatiles, and sugars. Results revealed the optimized extraction model was valid for total phenols ( $r = 0.98$ ), FRAP ( $r = 0.94$ ), and ABTS ( $r = 0.97$ ), increasing these parameters by 147%, 182%, and 89% respectively. The extract proved non-toxic ( $DL_{50} = 1379 \pm 504 \mu\text{L/mL}$ ). In fermentations, the COG group increased CO<sub>2</sub> production, total phenols, chlorogenic acid, and organic acids but reduced aromas and exhibited slight toxicity. EXT was non-toxic, with higher ethanol and lower CO<sub>2</sub>. Late additions prolonged fermentation while maintaining non-toxicity and elevating malic acid and residual sugar (~1%); COGAFT increased phenols, organic acids, and ethanol, while EXTAFT surpassed the control in phenolic content. Electron microscopy confirmed the comminuted mushroom acted as a support for *Saccharomyces cerevisiae*. It is concluded that *C. militaris* adds functionality to ciders, though elevated organic acid levels require sensory adjustments.

**Keywords:** apple fermented beverage; mushroom; alcoholic fermentation; hydroalcoholic extraction; antioxidant activity; toxicity; organic acids.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1. Estrutura química da cordicepina em comparação com a sua análoga adenosina.....                                                                                                                                                                                         | 34  |
| Figura 2. Partes de um dispositivo ultrassom.....                                                                                                                                                                                                                                 | 47  |
| Figura 3. <i>Cordyceps militaris</i> em crescimento em meio sólido.....                                                                                                                                                                                                           | 51  |
| Figura 4. Imagem ilustrativa das extrações com cogumelo inteiro ou cominuído em solução hidroalcóolica 7%.....                                                                                                                                                                    | 53  |
| Figura 5. Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes (porcentagem de etanol, amplitude e razão) sobre a concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante no ponto ótimo dos extratos de <i>C. militaris</i> ..... | 57  |
| Figura 6. Comparativo entre as estruturas do cogumelo seco cominuído pré e pós-extração.....                                                                                                                                                                                      | 59  |
| Figura 6. Fermentações com <i>airlock</i> tipo S.....                                                                                                                                                                                                                             | 66  |
| Figura 7. Fluxograma das fermentações e códigos utilizados para as amostras .....                                                                                                                                                                                                 | 66  |
| Figura 8. Liberação de dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) em fermentações controle e adicionada de extrato de cogumelo.....                                                                                                                                                    | 73  |
| Figura 9. Experimento com diferentes tratamentos no início da fermentação alcoólica.....                                                                                                                                                                                          | 74  |
| Figura 10. Produção de CO <sub>2</sub> nas fermentações controle, adicionada de cogumelo e adicionada de extrato.....                                                                                                                                                             | 75  |
| Figura 11. Cinética de crescimento celular das amostras controle, adicionada de cogumelo e extrato otimizado.....                                                                                                                                                                 | 76  |
| Figura 12. Produção de CO <sub>2</sub> por hora nas fermentações controle, COGAFT e EXTAFIT após adição no dia 12 da fermentação.....                                                                                                                                             | 77  |
| Figura 13. Contagem de células viáveis no controle e nas fermentações EXTAFIT e COGAFT .....                                                                                                                                                                                      | 78  |
| Figura 14. Evolução das cores da sidra controle durante os 15 dias de fermentação.....                                                                                                                                                                                            | 100 |
| Figura 15. Evolução das cores da sidra COG durante os 15 dias de fermentação.....                                                                                                                                                                                                 | 100 |
| Figura 16. Evolução das cores da sidra EXT durante os 15 dias de fermentação.....                                                                                                                                                                                                 | 101 |
| Figura 17. Evolução das cores da sidra COGAFT durante os 5 dias de fermentação.....                                                                                                                                                                                               | 101 |

|                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 18. Evolução das cores da sidra EXTAFt durante os 5 dias de fermentação.                                                                   | 102 |
| Figura 19. Comparativo das cores das diferentes formulações de sidra nos últimos dias de cada fermentação. ....                                   | 102 |
| Figura 21. Evolução da estrutura e da presença de leveduras nos resíduos do cogumelo cominuído após os dias amostrais da fermentação COG. ....    | 103 |
| Figura 22. Detalhes em FEG das leveduras encontradas no resíduo de cogumelo nas fermentações COG .....                                            | 104 |
| Figura 23. Evolução da estrutura e da presença de leveduras nos resíduos do cogumelo cominuído após os dias amostrais da fermentação COGAFt. .... | 104 |
| Figura 24. Foto comparativa da cor dos fermentados no tempo 0 da fermentação.                                                                     | 106 |
| Figura 25. Fotografia do fermentado adicionado de meio líquido no dia 0. ....                                                                     | 107 |
| Figura 26. Fotografia da cor do fermentado adicionado de meio líquido ao 10º dia.                                                                 | 107 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1. Funções estudadas para diferentes compostos do fungo <i>Cordyceps</i> spp.<br>.....        | 33 |
| Quadro 2. Estudos clínicos com <i>Cordyceps</i> spp. utilizado em diferentes problemáticas.<br>..... | 36 |
| Quadro 3. Relação de siglas e significados de cada grupo de fermentação. ....                        | 65 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                            |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1. Composição do meio de manutenção do <i>C. militaris</i> .....                                                                                    | 43  |
| Tabela 2. Planejamento experimental Box-Behnken para otimização da extração de compostos bioativos de <i>C. militaris</i> .....                            | 46  |
| Tabela 3. Resultados das análises físico-químicas dos cogumelos.....                                                                                       | 51  |
| Tabela 4. Resultados de teor de compostos fenólicos totais e antioxidantes nos diferentes extratos.....                                                    | 52  |
| Tabela 5. Concentração de compostos fenólicos e antioxidantes dos extratos de <i>C. militaris</i> .....                                                    | 54  |
| Tabela 6. Efeito das variáveis independentes sobre a concentração de compostos fenólicos e antioxidantes. ....                                             | 55  |
| Tabela 7. Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração do <i>C. militaris</i> . ....                                  | 58  |
| Tabela 8. Progressão do pH das fermentações durante os dias amostrais .....                                                                                | 75  |
| Tabela 9. Velocidades instantâneas de formação de CO <sub>2</sub> pré e pós o momento da adição do cogumelo e do extrato. ....                             | 77  |
| Tabela 10. Teores de sacarose, glicose, frutose e etanol nos dias iniciais e finais da fermentação. ....                                                   | 79  |
| Tabela 11. Valores de DL50 para as fermentações, extrato e mosto.....                                                                                      | 82  |
| Tabela 12. Progressão de compostos fenólicos totais e potenciais antioxidantes durante os dias das fermentações Controle, COG, EXT, COGAFT e EXTAFIT ..... | 84  |
| Tabela 13. Comparativo de fenólicos e potencial antioxidantes nos dias 0, 1 e 15 das fermentações controle, COG e EXT e 0 e 5 nas fermentações EXT.....    | 90  |
| Tabela 14. Teores de ácido clorogênico nas diferentes fermentações.....                                                                                    | 93  |
| Tabela 15. Quantificação de ácidos orgânicos nas diferentes fermentações. ....                                                                             | 95  |
| Tabela 16. Quantificação de compostos aromáticos das diferentes .....                                                                                      | 98  |
| Tabela 17. Progressão do pH na sidra adicionada de meio líquido fermentado .....                                                                           | 105 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                        | <b>15</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                          | <b>17</b> |
| <b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                                                                                | <b>18</b> |
| 1.1 FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA .....                                                                                                                           | 18        |
| 1.2 PROCESSAMENTO DE FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA.....                                                                                                           | 21        |
| 1.3 COMPOSIÇÃO .....                                                                                                                                           | 23        |
| 1.3.1 Compostos Fenólicos .....                                                                                                                                | 24        |
| 1.3.2 Compostos Aromáticos .....                                                                                                                               | 26        |
| 1.3.2.1 Álcoois primários .....                                                                                                                                | 27        |
| 1.3.2.2 Ésteres .....                                                                                                                                          | 28        |
| 1.3.2.3 Compostos carbonílicos .....                                                                                                                           | 29        |
| 1.3.2.4 Influência do nitrogênio na formação do aroma.....                                                                                                     | 29        |
| 1.4 UTILIZAÇÃO DE COGUMELOS EM BEBIDAS .....                                                                                                                   | 30        |
| 1.5 CORDYCEPS MILITARIS.....                                                                                                                                   | 32        |
| 1.5.1 Cordicepina.....                                                                                                                                         | 34        |
| 1.5.2 Uso de <i>C. militaris</i> por humanos e testes clínicos.....                                                                                            | 35        |
| 1.6 BEBIDAS COM <i>C. MILITARIS</i> .....                                                                                                                      | 37        |
| <b>CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE<br/><i>Cordyceps militaris</i> UTILIZANDO SOLVENTE VERDE ASSISTIDA POR<br/>ULTRASSOM.....</b> | <b>40</b> |
| 2.1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                           | 41        |
| 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                                                                  | 42        |
| 2.2.1 Produção do Cogumelo .....                                                                                                                               | 42        |
| 2.2.1.1 Meio sólido para cultivo dos cogumelos .....                                                                                                           | 42        |
| 2.2.1.2 Meio líquido de manutenção.....                                                                                                                        | 43        |
| 2.2.2 Caracterização Centesimal do Cogumelo .....                                                                                                              | 44        |
| 2.2.2.1 Análise de Umidade e Cinzas.....                                                                                                                       | 44        |
| 2.2.2.2 Análise de Proteínas .....                                                                                                                             | 44        |
| 2.2.2.3 Análise de Lipídeos .....                                                                                                                              | 45        |
| 2.2.3 Testes Preliminares de Extração de Fenólicos e Antioxidantes.....                                                                                        | 45        |

|                                                                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.4 Otimização da Extração de Compostos Bioativos do Cogumelo por Planejamento Experimental Box-Behnken .....         | 46        |
| 2.2.5 Análises de Compostos Fenólicos e Antioxidantes .....                                                             | 47        |
| 2.2.5.1 Análise de compostos fenólicos totais (TFC) .....                                                               | 47        |
| 2.2.5.2 Análise de antioxidantes pelo método de ABTS .....                                                              | 48        |
| 2.2.5.3 Análise de antioxidantes pelo método de FRAP .....                                                              | 48        |
| 2.2.5.4 Análise de antioxidantes pelo método de DPPH .....                                                              | 49        |
| 2.2.6 Quantificação de Cordicepina e Adenosina em UHPLC/MS .....                                                        | 49        |
| 2.2.7 Teste de Toxicidade em Artemia salina .....                                                                       | 50        |
| 2.2.8 Análise Estatística .....                                                                                         | 50        |
| 2.3 RESULTADOS .....                                                                                                    | 51        |
| 2.3.1 Caracterização do Cogumelo .....                                                                                  | 51        |
| 2.3.2 Análises dos Extratos de <i>C. militaris</i> .....                                                                | 52        |
| 2.3.3 Otimização da Extração Utilizando Box-Behnken .....                                                               | 53        |
| 2.3.3.1 Toxicidade do extrato otimizado .....                                                                           | 58        |
| 2.3.3.2 Imagens de microscopia eletrônica .....                                                                         | 58        |
| 2.4 CONCLUSÃO .....                                                                                                     | 59        |
| <b>CAPÍTULO 3 - FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FERMENTADO ALCÓOLICO DE MAÇÃ ADICIONADO DE <i>C. MILITARIS</i> .....</b> | <b>61</b> |
| 3.1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                    | 62        |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                           | 63        |
| 3.2.1 Fermentado Alcoólico de Maçã .....                                                                                | 63        |
| 3.2.1.1 Testes preliminares de fermentação com extrato de <i>C. militaris</i> .....                                     | 64        |
| 3.2.1.2 Fermentação do mosto de maçã com diferentes adições de cogumelo ...                                             | 64        |
| 3.2.2 Cinética e Análise dos Fermentados .....                                                                          | 67        |
| 3.2.2.1 Fenólicos totais, antioxidantes, cordicepina e adenosina .....                                                  | 67        |
| 3.2.2.2 Análise de açúcares por HPLC .....                                                                              | 67        |
| 3.2.2.3 Teor alcóolico .....                                                                                            | 68        |
| 3.2.2.4 Análise de ácidos orgânicos por HPLC .....                                                                      | 68        |
| 3.2.2.5 Toxicidade das sidras em <i>Artemia salina</i> .....                                                            | 68        |
| 3.2.2.6 Perfil fenólico .....                                                                                           | 68        |
| 3.2.2.7 Análise de compostos voláteis .....                                                                             | 69        |
| 3.2.2.8 Imagens em microscopia eletrônica de varredura .....                                                            | 70        |
| 3.2.2.9 Análise de cor .....                                                                                            | 70        |

|          |                                                                                                  |     |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.2.10 | <i>Análise estatística</i> .....                                                                 | 71  |
| 3.3      | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                          | 71  |
| 3.3.1    | Resultados dos Testes Preliminares de Fermentação.....                                           | 71  |
| 3.3.2    | Resultados da Cinética e Análises das Fermentações com Duração de 15 dias.....                   | 73  |
| 3.3.3    | Resultados da Cinética e Análises das Fermentações Adicionadas de Cogumelo no 12° Dia.....       | 76  |
| 3.3.3.1  | <i>Resultados da análise de açúcares por HPLC</i> .....                                          | 78  |
| 3.3.3.2  | <i>Resultados de toxicidade em Artemia salina das sidras com e sem adições de cogumelo</i> ..... | 81  |
| 3.3.3.3  | <i>Resultados das análises de compostos fenólicos totais e antioxidantes</i> ..                  | 82  |
| 3.3.3.4  | <i>Resultados comparados de TPC e antioxidantes</i> .....                                        | 89  |
| 3.3.3.5  | <i>Resultados da quantificação fenólica individual</i> .....                                     | 92  |
| 3.3.3.6  | <i>Resultados de ácidos orgânicos</i> .....                                                      | 94  |
| 3.3.3.7  | <i>Resultados da composição aromática dos fermentados</i> .....                                  | 97  |
| 3.3.3.8  | <i>Análise de cor</i> .....                                                                      | 99  |
| 3.3.3.9  | <i>Imagens em microscópio eletrônico de varredura</i> .....                                      | 102 |
| 3.3.4    | Resultados da Fermentação com Adição de Meio Líquido Fermentado .....                            | 104 |
| 3.4      | <b>CONCLUSÃO</b> .....                                                                           | 108 |
|          | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                                                                | 110 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                         | 111 |

## INTRODUÇÃO

A sidra é uma bebida alcoólica resultante da fermentação do mosto de maçãs, cujas propriedades sensoriais variam conforme a região de produção, tradições locais, variedades de maçã utilizadas e métodos tecnológicos aplicados no processamento. No Brasil, a produção de sidra utiliza predominantemente maçãs de mesa, como as variedades ‘Gala’ e ‘Fuji’. Essas cultivares proporcionam uma bebida com perfil sensorial mais suave, de baixa acidez e adstringência, e uma menor complexidade aromática. Outra característica das maçãs escolhidas para mosto é que elas não estão apropriadas ao comércio *in natura*, sejam por defeitos fisiológicos ou morfológicos como tamanho inadequado, cor ou forma inadequadas, manchas, batidas ou com escurecimento e que apresentam algum tipo de defeito no armazenamento.

Desta forma, a sidra brasileira se torna, culturalmente, uma bebida de consumo esporádico, relacionada a festas de fim de ano, e pouco valorizada, o que difere das mesmas bebidas produzidas na França, Inglaterra e Suíça, que tem tradição e investem em cultivares mais aromáticos, com teores de açúcares e nutrientes mais adequados para a fermentação e aceitação sensorial. Mesmo assim, segundo o relatório do IBGE (2018), o setor nacional aumentou a produção em 34% e o valor das vendas aumentou 78% de 2016 a 2018 (números relacionados ao total da categoria: sidra, hidromel e perada/poiré). Este crescimento ocorre devido a demanda por bebidas com teor alcoólico reduzido e sem a presença de glúten na sua constituição. Desta forma, o desenvolvimento de sidras com maior impacto sensorial e funcional se tornam importante para a valorização da matéria-prima e proporcionar uma maior diversidade de produtos com qualidade que possam ser consumidos ao longo do ano, impactando na renda dos produtores e empresas.

O *Cordyceps militaris* é um fungo conhecido por sua utilização milenar na medicina tradicional Chinesa; em sua composição encontra-se ergosterol, manitol, adenosina, cordicepina e exopolissacarídeos. O composto mais estudado neste fungo é a cordicepina, por sua função antitumoral (efeito apoptótico em células cancerígenas), anti-fadiga, antiolesterolêmico e antioxidante. Desta forma, este fungo se tornou um candidato, por meio de seus compostos bioativos e suas características sensoriais, a auxiliar no desenvolvimento de um produto fermentado de maçã que trouxesse maior complexidade aromática e de sabores, valorizasse o

produto nacional e favorecesse o crescimento da indústria de beneficiamento da maçã.

Este trabalho tem como objetivo o melhoramento funcional da sidra utilizando o fungo *Cordyceps militaris* na fermentação alcoólica, nas formas de cogumelo cominuído e extrato otimizado, adicionados ao mosto de maçã (dia zero) e no início da segunda fermentação (após 12 dias de fermentação).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação de *Cordyceps militaris* na fabricação da sidra a fim de melhorar a sua qualidade funcional.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização físico-química e bioativa do fungo desidratado;
- Otimizar a extração de compostos bioativos a partir de extratos aquosos e extratos hidroalcoólicos, com e sem auxílio de dispositivo ultrassônico;
- Definir protocolo para elaboração de fermentado alcoólico de maçã adicionado de *C. militaris* ou de seu extrato;
- Avaliar o efeito de diferentes apresentações do fungo no mosto (cogumelo seco cominuído, micélio seco, adição de extrato e adição de fermentado líquido fúngico) em relação aos parâmetros físico-químicos;
- Avaliar o efeito da presença do *C. militaris* na curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes formulações de sidra a partir da cinética de crescimento da levedura nas diferentes condições propostas;
- Avaliar a toxicidade do fermentado alcoólico de maçã com a presença e ausência do *C. militaris* em *Artemia salina* para definição preliminar da segurabilidade de ingestão;
- Verificar alterações nos principais compostos voláteis responsáveis pelo aroma do fermentado de maçã devido à adição de *C. militaris*.

## CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA

A sidra é uma bebida alcóolica, obtida exclusivamente da fermentação do mosto de maçã (*Malus domestica*). Segundo a legislação brasileira, deve conter entre 3 e 8% de teor alcóolico. Permite-se a adição de açúcar, sucos e polpas de frutas, vegetais e suas partes, e mel, mas em quantidades controladas para não descaracterizar o produto (MAPA, 2020).

O fermentado alcóolico é uma categoria mais ampla, também de acordo com a legislação (MAPA, 2012), ele deve ser fermentado com apenas uma fruta, ou seja, um fermentado de maçã deve ser exclusivamente fermentado a partir do mosto de maçãs. Em relação ao teor alcóolico, o fermentado pode variar de 4 a 14 % v/v.

A fermentação alcóolica é um processo anaeróbico realizado por microrganismos onde o açúcar é consumido e forma-se etanol e gás carbônico. A fermentação depende principalmente da quantidade e qualidade do carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio absorvidos. Para a sidra, as concentrações de nitrogênio são de grande importância, pois além de participarem ativamente na formação de odores característicos também evitam que a fermentação seja lenta (em concentrações acima de 75 mg/L) (Alberti *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015).

Diversos autores têm observado uma tendência de procura, principalmente por jovens-adultos, por bebidas diversificadas, inovadoras, naturais, produzidas localmente, com teor alcóolico moderado e sem glúten (Miles *et al.*, 2020; Alberti; Nogueira, 2021). Nos Estados Unidos, entre os anos de 2010 e 2018, o consumo *per capita* de 'bebidas especiais' (categoria que inclui a sidra) teve um aumento de 487%. Os jovens-adultos são os maiores consumidores da bebida no país, visto que a idade entre 18 e 29 consome sidra 3 vezes mais que a faixa etária dos 50 aos 64 anos (Statista, 2018).

Este crescimento de mercado se deve a fatores como o aumento da procura de produtos sem glúten, diminutos em grau alcóolico e pela iniciativa de grandes cervejarias em lançarem sidras em seu catálogo, como a *Heineken* e a *Stella Artois*. Avaliando os dados de 2017 a 2020, o país com maior consumo de sidra é o Reino Unido, que sozinho consome mais que os próximos 10 países (8.140.000,36 hL e 4.817.000,28 hL respectivamente). Na América Latina, em 2022, foram consumidos 1.555.000,29 hL de sidra, o que corresponde a 6,2% do consumo global (AICV, 2024).

O mercado latino vem em uma crescente, de 2023 a 2024 o consumo aumentou em 0,4% (AICV, 2023 e 2024)

O maior e mais tradicional mercado ainda é a Europa e as sidras produzidas têm características diferentes dependendo do país de origem. A sidra francesa é considerada encorpada, robusta e frutada, fermentada a partir do mosto de maçãs agri-doce, o que dá uma característica mais tânica e menos ácida. Quanto maior graduação alcoólica (alcohol by volume – ABV) mais seca, e quanto menor, mais tendência ao doce e a média de ABV varia de 2,0 a 4,0%. As sidras inglesas e irlandesas tem corpo e carbonatação médios em geral (porém, existem nichos de produção de tipos diversos nestes países), pode chegar a 8,5% ABV, mas a média é de 4,5 a 5,0%. As maçãs utilizadas também têm característica amargo-doce e são fermentadas até esgotamento de açúcares fermentescíveis, como característica nesses países, são adicionados açúcares após a fermentação (AICV, 2019).

As sidras polonesas, são produzidas principalmente com maçãs de mesa, consideradas suaves, de doçura e carbonatação média. Podem chegar a 8,5% ABV, mas tem como valor comum 4,5%, também é permitida a adição de açúcar após a fermentação (AICV, 2019).

Assim como a Polônia, as sidras brasileiras também são constituídas de maçãs de mesa, em sua maioria Fuji e Gala, que correspondem a mais de 90% da produção brasileira (Nogueira *et al.*, 2019). No Brasil, não existem sidras monovarietais, toda produção utiliza mais de um tipo de maçã no mosto (Alberti *et al.*, 2016).

Outra diferença na produção internacional e nacional está no tamanho. Enquanto na Inglaterra e na França, por exemplo, a sidra é produzida em larga, média e pequena escala, incluindo desde grandes indústrias até pequenos produtores de maçã, no Brasil a produção é exclusivamente industrial (Alberti; Nogueira, 2021).

Neste sentido, existe pouco estímulo no Brasil para o beneficiamento da maçã, para a diversificação das variedades e para a busca de sidras de maior qualidade, complexidade e variedade, diferentemente da viticultura brasileira, que investe em varietais para a produção de bebidas melhores, mais complexas e diferenciadas. O investimento em bebidas alcoólicas de maçã pode trazer aos produtores uma vantagem comercial, uma valorização da matéria-prima e o enriquecimento na diversificação da sidra nacional, não somente voltada a festas de fim do ano, mas também como uma opção leve, refrescante, com potencial de maior saudabilidade e que inclui outros grupos consumidores.

Uma alternativa para o melhoramento da sidra nacional estudada é a adição de crio-concentrado. Este método utiliza o congelamento para remover a água e concentrar o líquido, neste caso o mosto. Ao adicionar este ingrediente, elevam-se os teores de compostos fenólicos (57 % de aumento) e por consequência pode aumentar até aproximadamente 3 vezes o nível de antioxidantes. Esse aumento influencia na cor, que ganha mais intensidade, mas ao mesmo tempo traz a bebida uma adstringência mais pronunciada. Isso se traduziu em 81,6% de aceitação sensorial e 85% de intenção de compra (Carraro *et al.*, 2025).

Uma categoria diferente de sidra surge no mercado no final dos anos 80. A sidra aromatizada (*flavoured cider*), que continha adição de sucos de outras frutas e/ou saborizantes. Com base nas diferentes legislações de sidra no mundo, a sidra aromatizada pode conter junto a base tradicional outros ingredientes como frutas, sucos, extratos e aromatizantes (AICV, 2024). Este é o primeiro relatório em que a AICV divulga a porcentagem de mercado da sidra aromatizada, que ocupou 25% em 2023, comparado aos 71% da sidra tradicional.

Consideram-se os frutos e os vegetais como importante fonte de compostos bioativos (Shashirekha; Mallikarjuna; Rajarathnam, 2013). A curta vida de prateleira desses produtos, porém, e a iminente mudança climática, afetam a disponibilidade desses produtos para o consumidor final. Algumas tecnologias como secagem, liofilização e produção de artigos como geleias e conservas se tornam alternativas, porém apresentam desvantagens como perda de compostos bioativos, adição de compostos em excesso como açúcar ou sal, ou tem o preço mais elevado (Rios-Corripio *et al.*, 2022).

A fermentação alcoólica se torna um processo de transformação da fruta que pode ser vantajoso pela quantidade de compostos bioativos que se mantém na bebida, porém deve ser consumida com responsabilidade, tendo em vista a presença do etanol. Estuda-se também a questão da biodisponibilidade desses compostos benéficos quando em bebidas alcoólicas. Alguns pesquisadores chegaram à conclusão de que a fermentação alcoólica pode beneficiar a atividade antioxidante, anti-hipertensiva e antitrombótica, isso porque a matéria-prima tem os compostos fitoquímicos e as proteínas e peptídeos conjugados (menos biodisponíveis). Com a fermentação, ocorrem hidrólises e processos enzimáticos, que liberam esses compostos bioativos, tornando-os mais disponíveis para absorção pelo corpo humano

(Verardo; Gómez-Caravaca; Tabanelli, 2020; Verni; Verardo; Rizzello, 2019; García *et al.*, 2013).

Além da produção de etanol e gás carbônico, as leveduras responsáveis pela fermentação alcoólica produzem metabólitos secundários, como aromas e sabores diferentes dos presentes na fruta. Isso a torna atrativa sensorialmente e cria um mercado em que bebidas mais complexas e com processos diferentes são mais valorizadas pelos consumidores.

## 1.2 PROCESSAMENTO DE FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA

O processo se inicia com o recebimento das maçãs, quando é feita a seleção, eliminando aquelas contaminadas, batidas e inaptas para o processo. Após selecionadas, as maçãs são lavadas e sanitizadas. Em moinho de martelos, as maçãs são trituradas e então levadas à prensa. Nessa etapa obtêm-se o mosto de maçã, pode-se adicionar metabissulfito de potássio (em concentração entre 70 e 150 mg/L). Adicionam-se enzimas pectinolíticas ao mosto que vão precipitar a pectina e clarificar o mosto; esta etapa acontece por 6 a 10 horas e então o mosto é trasfegado, realizando a separação do precipitado.

O mosto pode ser adicionado de leveduras industriais (de 20 a 40 g/hL) ou pode ser fermentado de forma lenta e temperaturas reduzidas (entre 7 e 10 °C) com as leveduras selvagens presentes no mosto. A fermentação alcoólica ocorre em fermentadores munidos de batoque ou *airlock* que permitem a saída de gás carbônico formado na fermentação, sem permitir a entrada de oxigênio. Esta fermentação pode durar o tempo necessário para esgotar o açúcar disponível, tendo sido metabolizado em etanol e gás carbônico, ou pode-se interromper este processo, deixando propositalmente açúcar residual na bebida.

Se ao final da fermentação alcoólica a acidez for muito alta, é possível realizar a fermentação malolática, um período de 20 a 35 dias em que o ácido málico é convertido em ácido láctico, diminuindo o gosto ácido. Para conservação, é possível realizar a adição de metabissulfito de potássio ou sorbato de cálcio (as concentrações são variáveis dependendo da legislação de cada país). A sidra é então clarificada, adicionada de CO<sub>2</sub>, pode ou não ser pasteurizada e envazada em garrafas (Alberti; Nogueira, 2022).

O processo fermentativo da sidra é dividido em duas etapas: a fermentação alcoólica e a fermentação secundária (ou malolática), que pode ocorrer ou não. A fermentação alcoólica divide-se em fase oxidativa, onde os aromas se formam, e a fase fermentativa, onde os microrganismos transformam os carboidratos em etanol e gás carbônico. Os açúcares e os aminoácidos da sidra inicialmente contribuem para a reprodução celular e secundariamente para formação de outros compostos, como os compostos aromáticos (Alberti; Nogueira, 2022).

Na fermentação oxidativa as leveduras originárias do mosto, chamadas de não-*Saccharomyces*, dominam o meio, enquanto as *S. cerevisiae* (normalmente adicionadas ao mosto) começam seu crescimento. As leveduras oxidativas podem realizar este processo por 5 a 15 dias e consomem cerca de 10 g/L de açúcares e 30 a 40 mg/L de nitrogênio. Essa fermentação ocorre a uma temperatura entre 7 e 15 °C. As leveduras oxidativas produzem grande quantidade de enzimas, que interagem com precursores de aromas. Portanto, essa fase é de grande importância para a complexidade aromática da bebida, principalmente tendo em vista que as *S. cerevisiae* funcionam com o metabolismo mais voltado para a produção de álcool que de enzimas. No entanto, as leveduras oxidativas são sensíveis ao álcool, e à medida que as *S. cerevisiae* crescem e produzem etanol e gás carbônico pela fermentação, elas inibem as leveduras oxidativas.

A adição de compostos como anidrido sulfuroso, para evitar escurecimento enzimático e diminuir a quantidade de microrganismos que degeneram o produto, pode diminuir a ação das leveduras oxidativas, ou até mesmo cessá-las. As sidras que são fabricadas apenas com a fermentação alcoólica, costumam ter odores mais neutros e menos complexos. Por outro lado, quando a fermentação ocorre apenas com leveduras oxidativas, que acabam por realizar a fermentação alcoólica depois de algum tempo, também não é vantajosa, pois nesses casos ocorre a produção exacerbada de acetato de etila, que em pequenas quantidades colabora com o aroma frutado, porém em maiores quantidades é prejudicial para o buquê (Alberti; Nogueira, 2022).

O metabolismo da *S. cerevisiae* é dividido em primário e secundário. No primário realizam-se as tarefas primordiais como crescimento, divisão celular e sobrevivência (produzindo metabólitos como o etanol e ácido acético). No metabolismo secundário são produzidos compostos não-essenciais para o

crescimento, como ésteres, compostos carbonílicos, sulfúricos, tiols e terpenoides (Hirst; Richter, 2016).

Na fase fermentativa a *S. cerevisiae* transforma a cor, a acidez, a adstringência, a doçura, a composição volátil, polifenólica e antioxidante do mosto de maçã, além da produção alcóolica (Wei *et al*, 2020). A conversão dos açúcares em etanol e gás carbônico na sidra pode ser parcial ou total. A parcial é aquela que interrompe a fermentação ao alcançar os níveis desejados de álcool e açúcar residual, enquanto a total, como o nome sugere, leva a fermentação até o esgotamento dos açúcares fermentescíveis.

Este processo pode ser realizado de forma lenta (30 a 60 dias), realizando algumas estratégias como utilizar temperaturas mais baixas (entre 7 e 15 °C) e realizar a clarificação (por meio de filtração ou centrifugação, por exemplo). A vantagem desse modo de fermentação é principalmente a maior formação de aromas e sabores.

No processo de fermentação rápida (de 7 a 15 dias) os aromas mais predominantes são aqueles aromas de levedura ou de fermentação, que substituem os aromas frutados produzidos numa fermentação mais longa. A desvantagem e o cuidado na fermentação rápida devem estar na formação de compostos como o diacetil e a acetoína, pois elas trazem um odor rançoso para o produto e que são produzidos principalmente com as temperaturas maiores do processo e com a população elevada de leveduras (Alberti; Nogueira, 2022).

### 1.3 COMPOSIÇÃO

Neste tópico, serão abordadas as principais classes de compostos presentes no mosto de maçã e na sidra, assim como a importância da presença desses compostos e um comparativo das composições do mosto (antes da fermentação) e da sidra (após fermentação). A partir deste ponto será dada prioridade para informações de maçãs de mesa, que será o tipo de maçã utilizada neste trabalho, visto que é a maçã utilizada na sidra nacional, porém em alguns momentos serão feitos comparativos com as maçãs industriais, voltadas para a produção de sidra.

O mosto de maçã é formado principalmente de açúcares, sendo a frutose a maior parcela da composição (32 a 115 g/L), seguida pela glicose e pela sacarose. Dentro da composição de carboidratos, também é possível encontrar, em menor

quantidade o sorbitol. A composição total de açúcares está entre 76 e 163 g/L (Alberti; Nogueira, 2022).

Os aminoácidos presentes no mosto de maçã ficam entre 512 e 1184 mg/L. Os compostos nitrogenados são de extrema importância para a fermentação, pois favorecem a multiplicação celular, a formação de enzimas e são precursores de aromas. Os principais aminoácidos presentes no mosto são a asparagina, a glutamina, o aspartato, o glutamato e a serina. A composição proteica das maçãs varia de acordo com a variedade, com o local de produção, com a época de colheita, quantidade de chuvas e nível de maturação (Alberti; Nogueira, 2022).

O nitrogênio é um nutriente limitante na fermentação, sua falta diminui o crescimento celular e se combinado com baixas concentrações de oxigênio dissolvido, resulta em uma fermentação vagarosa e “travada”, que não se traduz neste caso em maior produção de aromas, pois a levedura não tem nutriente suficiente. Níveis abaixo de 75 mg/L de nitrogênio são considerados baixos.

Dentre os minerais, o mosto apresenta potássio (861 a 2628 mg/L), cálcio (3 a 141 mg/L), fósforo (53 a 111 mg/L) e magnésio (18 a 52 mg/L). Sua composição fenólica total está entre 86 e 525 mg/L (Alberti; Nogueira, 2022).

A composição base da sidra é água, açúcares, ácidos orgânicos (ácido láctico, acético e málico), etanol (que varia de porcentagem de acordo com as legislações vigentes em cada país), minerais (sódio, potássio, cálcio, magnésio), vitaminas (normalmente B2, B5, B6, B8, B9 e B12) e compostos fenólicos como a catequina, rutina, ácido gálico, quercetina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido cinâmico (Wei *et al.*, 2020).

### 1.3.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são produto do metabolismo secundário de plantas e microrganismos. Eles contêm em sua estrutura ao menos um grupo fenol, ou seja, um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas. O grupo de compostos fenólicos vegetais tem mais de 10.000 compostos catalogados e uma grande diversidade química, portanto exercem diversas funções nas plantas, como defesa de predadores, atração de polinizadores, defesa contra raios UV e redução de competição de outras plantas ao redor.

Em relação a sua origem nas plantas, devido a heterogeneidade dos compostos fenólicos, também há uma diversidade de rotas envolvidas. As duas rotas mais importantes são a do ácido chiquímico e a do ácido malônico.

Na rota do ácido chiquímico, os precursores de carboidratos que saem da glicólise e da rota pentose-fosfato são convertidos em aminoácidos aromáticos. Essa rota produz compostos como a fenilalanina, a tirosina e o triptofano. A partir da fenilalanina, as plantas sintetizam os principais compostos fenólicos (Taiz; Zeiger, 2013).

A quantidade de fenólicos na maçã e por consequência nos seus derivados, depende de fatores como a variedade, a maturação, das condições e do local de cultivo, além dos métodos de processamento, como o tipo de prensagem (Alberti; Nogueira, 2022). Durante o processamento da maçã, a oxidação é responsável pela maior perda de compostos fenólicos. Esta oxidação é catalizada pelas enzimas polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD). A quantificação de compostos fenólicos totais é feita pelo método de Folin-Ciocalteau (Granato; Nunes, 2016) e nas maçãs brasileiras o teor pode variar de 456 a 1583 mg/kg de acordo com o estudo de Zardo *et al.* (2015).

Os flavonoides são compostos de grande interesse por possuírem grande capacidade antioxidante, isso acontece pela presença de um grupo o-dihidroxila em um de seus anéis e pela dupla ligação entre seus carbonos 1 e 2 juntos à um grupo oxo. Além disso, os flavonoides possuem a presença de hidroxilas nos carbonos 3 e 5 e grupos hidroxila com posições favoráveis (Boroski, 2015). A presença do grupo orto-di-hidroxi e cetol em sua estrutura química causa a quelação de metais, que é o princípio da técnica para a detecção destes compostos.

Em geral, os antioxidantes são definidos como compostos capazes de diminuir a oxidação, seja em sistemas biológicos, como a pele, as células, quanto em alimentos e cosméticos. Os radicais livres possuem um ou mais elétrons desemparelhados e fazem parte normalmente do corpo humano, atuando como mediadores de transferência de elétrons no metabolismo, como na respiração celular. Estas espécies reativas ao oxigênio (ROS) prejudicam o organismo quando em quantidades descomedidas, gerando estresse oxidativo (Barbosa *et al.*, 2010).

As análises de atividade antioxidante fornecem dados para a medida da capacidade de um composto ou conjunto de compostos em sequestrar radicais livres, identificando assim produtos que possam auxiliar na nossa obtenção de antioxidantes

tanto na dieta quanto para outros propósitos, como conservação de alimentos (Zardo *et al.*, 2015). Os métodos mais utilizados para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* utilizam compostos sintéticos com um radical colorido ou redox-ativo, sendo possível verificar a variação em espectrofotômetro. Dentre esses métodos podemos citar o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), FRAP (poder antioxidante redutor de ferro) e CUPRAC (capacidade antioxidante redutora de íon cúprico).

As principais categorias de compostos fenólicos na maçã são os ácidos fenólicos e os flavonoides. A presença destes compostos está relacionada ao amargor, a adstringência e parte da cor nos fermentados de maçã, ajudando a compor o corpo da bebida. Esta é mais uma diferença de maçãs industriais selecionadas com a finalidade de compor uma bebida fermentada, elas têm aproximadamente 30 vezes mais compostos fenólicos que as maçãs de mesa, utilizadas na produção nacional de sidra (Alberti; Nogueira, 2022).

Alguns compostos fenólicos como as procianidinas são responsáveis pelo amargor e adstringência. A oxidação do ácido clorogênico, das procianidinas e das catequinas contribuem com a cor da bebida. Além disso, alguns ácidos hidroxicinâmicos são precursores de compostos voláteis, participando da formação do aroma na sidra (Verdu *et al.*, 2013).

A fermentação da sidra diminui a quantidade de fenólicos totais do mosto em média 30%, porém essa quantidade depende da variedade da maçã e estágio de senescência, podendo alterar a quantidade e compostos decrescidos. Na maçã *Gala*, os compostos mais afetados na fermentação foram os ácidos fenólicos, enquanto na maçã *Fuji Suprema* foram os flavonoides. Ainda assim, a variedade *Gala* e *Lis Gala*, demonstraram maior quantidade de compostos fenólicos e uma maior atividade antioxidante pelas análises FRAP e DPPH, respectivamente. Desta forma, a utilização das maçãs *Gala* e *Lis Gala* para a produção de sidra, dentre as maçãs analisadas pelos estudos apresentados, obtém maiores teores, tendo em média 822  $\mu\text{molTE/L}$  (Da Silva *et al.*, 2019).

### 1.3.2 Compostos Aromáticos

Os compostos aromáticos presentes no mosto e nas bebidas fermentadas de maçã variam por diversos motivos, como a maturação da fruta, o processamento, a fermentação, o tipo de levedura usada, a oxidação e o envelhecimento, por exemplo.

Os principais compostos de aromas presentes na sidra são os ésteres, álcoois superiores, compostos carbonílicos, ácidos graxos voláteis, aldeídos e ácidos (Pinto; Vilela, 2021).

A participação de um composto na composição global do aroma depende do seu limiar de odor (*threshold*), que é a mínima concentração a qual um composto pode ser detectado pelo cheiro. O VAO (valor de atividade de odor), é a relação entre a concentração de um composto e o seu limiar de odor.

#### 1.3.2.1 Álcoois primários

Durante a fermentação os álcoois primários são os compostos voláteis mais amplamente produzidos. Pertencem a este grupo o propanol, o álcool isoamílico, o 2-feniletanol. Álcoois primários são assim classificados por estarem ligados a um carbono primário. Esses álcoois são formados pela via metabólica de Ehrlich ou pelo metabolismo central de carbono. Ainda não se conhecem todas as enzimas envolvidas nessas vias (Stanzer *et al.*, 2023).

Os álcoois primários podem ter impactos positivos ou negativos no aroma global da bebida, dependendo da quantidade em que se apresentam. Concentrações de álcoois primários iguais ou superiores a 400 mg/L podem resultar em aromas pungentes e com semelhança a solventes, enquanto quantidades abaixo de 300 mg/L conferem aromas de característica frutada. Nas sidras, os álcoois primários, principalmente o 2-feniletanol, são fundamentais para a composição do *flavor*<sup>1</sup> típico da bebida. O 2-feniletanol é descrito como tendo um aroma de mel e floral.

A via de Ehrlich envolve três etapas, uma transaminação que tem como composto resultante um  $\alpha$ -cetoácido, a descarboxilação desse composto e a redução formando um álcool fusel (ou álcool superior) (Teixeira, 2015). Álcool fusel é o termo dado aos álcoois superiores formados na fermentação e que são considerados indesejáveis quando em excesso, porém, em baixas concentrações, ajudam na complexidade da bebida. Álcoois superiores são aqueles com 3 ou mais carbonos em sua composição (incluindo os fuséis).

---

<sup>1</sup> Flavor pode ser definido como conjunto de moléculas voláteis e não-voláteis que constroem o aroma, o sabor e a sensação na boca, sendo um conjunto sensorial que acontece estando um relacionado ao outro.

Apesar de não haver um limite expresso de álcoois superiores, a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2021) e o estudo de Ribéreau-Gayon (2006) indicam valores máximos entre 400 e 500 mg/L.

O propanol, o butanol e o isobutanol são descritos como tendo um odor alcóolico, já o álcool amílico e o isoamílico possuem um odor de banana e amêndoas. A importância dos álcoois primários na sidra também pode ser definida pela sua participação como precursores de outros aromas importantes, os ésteres de acetato (Wang *et al.*, 2024).

#### 1.3.2.2 Ésteres

Os ésteres, mesmo em pequena concentração, contribuem de forma efetiva na qualidade sensorial da bebida. Eles trazem os aromas florais e frutados e se formam principalmente no metabolismo secundário das leveduras. A reação para formação dos ésteres necessita de um álcool, uma acetilcoenzima A (acetil-CoA), uma enzima sintetizadora de éster e uma adenosina trifosfato (ATP). Os ésteres dividem-se em dois grupos principais: os ésteres de acetato e os ésteres de etila.

Os ésteres de acetato se formam a partir da esterificação da acetil-CoA e do etanol ou de álcoois complexos vindos do metabolismo de aminoácidos. Estes compostos são mais facilmente identificados na bebida pois normalmente se apresentam em quantidades mais elevadas. Pode-se citar como representantes deste grupo o acetato de etila (descrito como odor frutado agradável) e acetato de isoamila (odor de banana). O acetato de etila é o mais comum em bebidas alcóolicas pela quantidade de etanol resultante nos processos metabólicos e pela facilidade de reação dos álcoois primários (Hirst; Richter, 2016).

Já os ésteres de etila têm sua formação ligada por um lado ao etanol e por outro aos ácidos graxos de cadeia média, que fornecem o grupo acila. O hexanoato e o octanoato de etila dão o cheiro característico de maçã e exemplificam este grupo de compostos, assim como o decanoato de etila, que traz um aroma mais floral para a bebida (Santos, 2011). Os ésteres de etila variam quanto a descrição sensorial, mas são normalmente descritos como tendo aroma de maçã, morango, pera e anis.

Durante o final da fase exponencial de crescimento da levedura, os ácidos-graxos de cadeia média são liberados do complexo citoplasmático de síntese de ácidos-graxos. Isso ativa a síntese os ésteres.

#### 1.3.2.3 Compostos carbonílicos

O diacetil tem um aroma descrito como levemente tostado, caramelo e nozes, porém em altas concentrações, passa a trazer um aroma rançoso. As leveduras são capazes de sintetizar o diacetil durante a fermentação, no entanto são as bactérias lácticas que predominantemente realizam essa produção. O diacetil é formado fora da célula (extracelular), por uma descarboxilação do  $\alpha$ -acetolactato. Uma vez produzido, esse composto pode ser convertido a acetoína ou butano-2,3-diol, ambos com um *threshold* mais alto, e por isso menos significativos para a formação do aroma final (Santos, 2011).

#### 1.3.2.4 Influência do nitrogênio na formação do aroma

A adição de nitrogênio no mosto deficiente deste mineral é um processo comumente utilizado pelas indústrias de sidra (Alberti; Nogueira, 2022). Essa adição tem como objetivo suplementar o mosto para o crescimento celular e para a formação de aromas. Conforme visto nos tópicos anteriores, algumas vias metabólicas como a via de Ehrlich, utilizam do catabolismo de aminoácidos para a formação de álcoois superiores.

Barbosa *et al.* (2009) avaliou a adição de nitrogênio em mosto de uva em diferentes momentos da fermentação e a sua consequência na formação de aromas. Este autor percebeu que a adição de nitrogênio durante a fase estacionária da levedura (72h) reduziu a formação de etanol e ácido acético pelas três cepas testadas quando comparado às fermentações em que o nitrogênio foi adicionado antes do início da fermentação. A acidez volátil também diminuiu com a adição do nitrogênio na fase estacionária. Isso se explica pela priorização das células pelo crescimento e pela produção de NADH em condições de aumento de disponibilidade de nitrogênio.

Em relação ao 2-feniletanol e ao álcool isoamílico, a tendência é de uma relação inversamente proporcional à concentração de nitrogênio, porém, quando o estudo adicionou o nitrogênio na fase estacionária, os álcoois superiores já tinham sido produzidos pela levedura que estavam até então em meio deficiente de nitrogênio. A adição na 72ª hora da fermentação aumentou a produção de ésteres etílicos e ésteres de acetato. Estes resultados foram observados na fermentação do vinho, mas é possível que isso se observe também na fermentação do mosto de maçã,

porém até o presente momento não existem estudos direcionados a isto (Barbosa *et al.*, 2009).

#### 1.4 UTILIZAÇÃO DE COGUMELOS EM BEBIDAS

Cogumelos comestíveis são alimentos nutritivos, funcionais e considerados saudáveis pelas suas baixas calorias, alto teor proteico, alto conteúdo de fibras, vitaminas e minerais. A aplicação de cogumelos em bebidas é relativamente antiga, tendo em vista a utilização de chás e sendo parte de culturas indígenas, chinesas, indianas e tibetanas, por exemplo (Mckenna; Jones; Hughes, 2012). Seja em sua forma *in natura*, seco, ou até mesmo seu extrato, a utilização em estudos ainda é recente e está atrelada principalmente a questões legislatórias, culturais, sensoriais e aos avanços de estudos científicos.

Os cogumelos mais comumente estudados para aplicação em bebidas são o Shiitake (*Lentinus edodes*) (Wang *et al.*, 2023; Qiu; Zhang; Chang, 2022), *Ganoderma lucidum* (XIN *et al.*, 2020), *Trametes versicolor* (Liu *et al.*, 2023), Juba de leão (*Hericium erinaceus*) (Makhamrueang *et al.*, 2021), *Pleurotus eryngii* (Cirlincione *et al.*, 2023).

As pesquisas se voltam a adição dos cogumelos principalmente para conferir propriedades funcionais às bebidas. Os cogumelos têm composições extremamente variadas e a escolha do fungo depende da propriedade desejada, seja ela sensorial (aroma, sabores, textura) ou de saudabilidade. Os polissacarídeos fúngicos são uma classe de compostos estudada pela sua bioatividade, principalmente imunomodulatória. No shiitake existe o lentinano, um polissacarídeo betaglucano com uma ligação glicosídica  $\beta$ -1,3:  $\beta$ -1,6. Esse polissacarídeo é conhecido pela sua função imunomoduladora, atua mitigando sintomas exacerbados ou anormais do sistema imune ou melhorando a resposta imune humoral e celular (Wang *et al.*, 2023). Quando de alta pureza, ele é usado como medicamento, porém, nos extratos complexos retirados do cogumelo em que ele se encontra em menores concentrações, pode-se utilizar como suplemento alimentar ou parte constituinte de formulações de bebidas funcionais.

Na China usa-se o extrato bruto na maioria das bebidas feitas de shiitake com objetivo de reforço imunológico. No Brasil, não existe uma legislação específica que regulamente a adição de cogumelos em bebidas ou bebidas com base de cogumelos,

sejam elas fermentadas ou não. A bebida de cogumelo ou o uso deste como ingrediente segue a Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999, que dispõe sobre registro de alimentos ou novos ingredientes (ANVISA,1999).

Pode-se citar algumas das bebidas encontradas na literatura e nos mercados internacionais como kombucha, café, chá, bebidas mistas funcionais, fermentados de cogumelo, cervejas e vinhos.

O processo para fazer café de cogumelos (*mushroom coffee*) envolve liquefazer e secar diferentes tipos de cogumelo para fazer um extrato que é então misturado com o café regular. O pó do cogumelo pode ser também misturado ao pó de café e extraídos juntos. O cogumelo pode adicionar diversas propriedades como antioxidantes, imunomoduladores, reguladores de açúcar no sangue e até mesmo balancear a acidez do café, evitando problemas como a gastrite.

Os chás de cogumelos são extremamente antigos e tradicionais, foram e ainda são parte de rituais religiosos, culturais e sociais. Os chás são infusões do cogumelo em água usando cogumelos comestíveis, medicinais ou psicodélicos. Existem muitas variações no modo de fazer a infusão, como diferentes tempos, temperaturas e uso de vitamina C, como ao adicionar limão ou laranja no chá (Srivastava; Attri; Sharma, 2020).

Su *et al.* (2022) desenvolveu e estudou uma bebida feita a partir de chá verde adicionada do fungo viável do cogumelo Houbitake (*Pleurotus sajor-caju*) para uma co-fermentação com objetivo de melhorar o *flavour* e a qualidade. O estudo concluiu que essa co-fermentação foi capaz de reduzir o *flavour* herbal e gramíneo, enquanto os conteúdos de geraniol e linalol foram aumentados, que junto com a produção do metil salicilato (vinda do cogumelo) trouxeram uma característica frutal e floral para a bebida. A co-fermentação também diminuiu o conteúdo de polifenóis que causou diminuição na adstringência e no amargor.

Quando o fungo viável é adicionado para participar da fermentação da bebida, uma das dificuldades é encontrar aqueles que se adaptam às condições da fermentação, como a baixa acidez e a disponibilidade ou não de oxigênio. Cogumelos que degradam madeira, segundo Udhav *et al.* (2021), se adaptam melhor a essas condições.

### 1.5 *Cordyceps militaris*

O *Cordyceps militaris* é uma espécie de fungo entomopatogênico (termo que representa a infecciosidade em insetos) que foi reconhecida como mais adaptada ao cultivo laboratorial do que espécies como *Cordyceps sinensis* (Shrestha *et al.*, 2012).

Em estudo metabolômico comparativo entre os dois gêneros realizado por Chen *et al.* (2018) foi concluído que o *Cordyceps sinensis* tem uma maior carga de compostos bioativos e com algumas diferenças de compostos com o *Cordyceps militaris*, porém segundo Zhou, Li e Tian (2014) o primeiro oferece poucas condições de produção industrial. Com isso em vista, o *C. militaris* oferece uma solução mais interessante por se adaptar melhor e ainda oferecer uma quantidade de bioativos significativa.

Seu corpo frutificado é culturalmente utilizado em chá em países orientais como a China, Tibete e Índia. No sequenciamento do DNA deste fungo não foram encontrados ortólogos de micotoxinas que afetem humanos (Zheng *et al.*, 2011), o que justifica sua longa utilização como bebida “medicinal” por estes povos.

Hur (2010) estudou a composição de macromoléculas deste cogumelo, encontrando: 69,32mg/g de aminoácidos (maior abundância de lisina, ácido glutâmico, prolina e treonina). A formação de lipídeos é de 70% de ácidos graxos de cadeia insaturada, sendo o ácido linoleico o mais considerável em quantidade.

Os compostos mais largamente estudados neste fungo são a cordicepina e a adenosina, dois nucleosídeos presentes no micélio e no corpo frutificado, que serão abordados no próximo tópico, além de uma gama de polissacarídeos com funções bioativas.

O quadro 1 apresenta diferentes pesquisas utilizando diferentes partes e compostos do *C. militaris* para diferentes funções.

Quadro 1. Funções estudadas para diferentes compostos do fungo *Cordyceps* spp.

| Tipo de extrato                                  | Composto                                                        | Função estudada                                                                                                                                             | Tipo de estudo  | Estudo                           |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|
| Aquoso                                           | CPS-1 (polissacarídeo)                                          | Antiinflamatória                                                                                                                                            | <i>In vivo</i>  | Yu <i>et al.</i> , 2004          |
| Aquoso                                           | Enzima fibrinolítica                                            | Serina protease semelhante à quimiotripsina - atividade de ligação à fibrina                                                                                | <i>In vitro</i> | Kim <i>et al.</i> , 2006         |
| Ácido acético, mercaptoetanol e cloreto de sódio | CMP (Proteína)                                                  | Ação apoptótica                                                                                                                                             | <i>In vivo</i>  | Bai; Sheu, 2018                  |
| MeOH e H <sub>2</sub> O                          | Ácido linoleico, oleico e outros de cadeia insaturada e manitol | Estudo da presença e quantificação dos compostos                                                                                                            | <i>In vitro</i> | Chen <i>et al.</i> , 2018        |
| Aquoso                                           | CM1 e CMS (polissacarídeos)                                     | Melhora da saída do colesterol das células                                                                                                                  | <i>In vitro</i> | Hu <i>et al.</i> , 2019          |
| Aquoso                                           | Extrato complexo                                                | Efeito citotóxico em células de câncer colorretal HT29, atividade antioxidante                                                                              | <i>In vitro</i> | Mohd Azrie <i>et al.</i> , 2020  |
| Aquoso e etanólico                               | Extrato complexo                                                | Efeito anti-bacteriano contra <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Cutibacterium acnes</i> e <i>S. aureus</i> resistente a metilina (MRSA) | <i>In vitro</i> | Eiamthaworn <i>et al.</i> , 2022 |

**Fonte:** autoria própria

**Nota:** CPS-1: Polissacarídeo 1 do *C. militaris*. CMP (*Cordyceps militaris protein*): proteína do *Cordyceps militaris*. MeOH: Metanol. H<sub>2</sub>O: Água. CM1 e CMS: polissacarídeos solúveis em água identificados no *C. militaris*. HT29: linhagem de células de câncer colorretal.

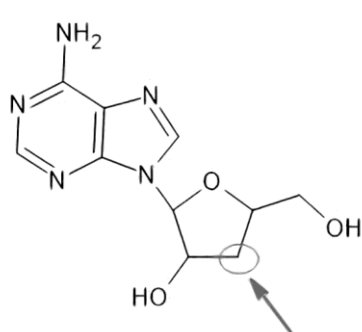
Observa-se que diferentes frações do fungo têm diferentes compostos presentes, e que extrações diversas fornecem benefícios diversos.

### 1.5.1 Cordicepina

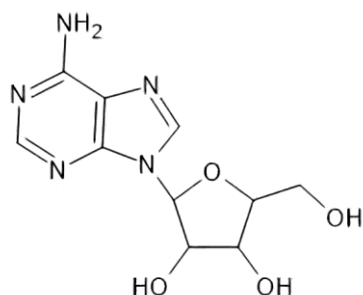
A cordicepina ( $C_{10}H_{13}N_5O_3$ ) é um nucleosídeo de purina que por ser muito similar à adenosina (apenas uma hidroxila a menos) age como um antimetabólito pois a inibe por competição. Pela sua semelhança com a adenosina (Figura 1), ela é aceita pelo corpo humano, mas ao entrar na célula no lugar da adenosina ela atrapalha a manutenção das funções normais celulares, como a replicação celular, ou então forçando a apoptose (morte celular).

Figura 1. Estrutura química da cordicepina em comparação com a sua análoga adenosina.

Cordicepina



Adenosina



**Fonte:** autoria própria.

Apesar desta ação apoptótica, Aramwit e colaboradores (2015) testaram a citotoxicidade desta molécula em células não cancerígenas e cancerígenas (A549 – células de câncer de pulmão) e concluíram que em 24 horas a viabilidade celular das células não cancerígenas foi de 95 a 100%, enquanto as células cancerígenas tiveram sua viabilidade diminuída para 60 a 80%, confirmando a não toxicidade e aplicabilidade para tratamentos oncológicos.

Neste mesmo estudo foram realizados testes *in vivo* e *in vitro* de toxicidade e mutagenicidade (teste de Ames), respectivamente. Como resultado em comparação ao controle negativo (tampão fosfato) a cordicepina teve de 1,19 a 1,81 vezes mais colônias revertentes. Comparativamente, o controle positivo (azida de sódio) teve 19,29 vezes a mais que o controle negativo, demonstrando a não mutagenicidade da cordicepina, mesmo em concentrações aumentadas.

No teste de toxicidade em ratos que receberam 1 mL de cordicepina nas concentrações 0,25 e 1 mg/mL por 30 dias, não foram observadas mudanças significativas nas células nem nos exames clínicos. A análise de órgãos *post mortem* mostraram similaridade com o grupo controle e normalidade dos órgãos, concluindo pela não toxicidade da cordicepina.

#### 1.5.2 Uso de *C. militaris* por humanos e testes clínicos

O uso do cogumelo *Cordyceps* spp. em forma de chá, pó ou tintura, data de 3000 anos atrás (Shrestha *et al.*, 2010), entretanto, as pesquisas científicas, especialmente os estudos clínicos são recentes e escassos.

No site da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (USNLM, 2024) é possível consultar os estudos clínicos desenvolvidos com determinada substância. Com o termo '*cordycepin*' é possível encontrar 3 estudos nos status: em desenvolvimento e concluído. Com o termo '*Cordyceps*' é possível encontrar 25 estudos clínicos, também em diferentes fases.

No Quadro 2 estão relacionados artigos publicados sobre estudos clínicos de diversos efeitos relacionados a este fungo. Os estudos relacionados neste quadro compreendem um total de 3270 voluntários. A dose média máxima (incluindo a dose máxima de estudos com mais de uma dose) utilizada foi de 1,5 g/dia da substância cordicepina, micélio ou fermentado do fungo. Dentre os resultados 3 dos 7 estudos analisados não obtiveram diferença significativa entre os grupos, 2 observaram melhorias e/ou segurança na utilização e 2 revisões observaram algumas inconsistências na metodologia, podendo indicar viés dos autores.

Tendo em vista os testes de segurança, a quantidade de participantes dos estudos e a quantidade de tempo utilizado como bebida, medicinal ou não, é possível afirmar que até o momento os estudos indicam a sua segurança, tendo com essa dose diária, pouco ou nenhum efeito adverso. Entretanto, quanto a sua eficácia medicamentosa, ainda é objeto de estudo e confirmação.

Quadro 2. Estudos clínicos com *Cordyceps* spp. utilizados em diferentes problemáticas.

| Estudo                                                                                                                                          | Tipo de estudo                                                              | População                                                                          | Dosagem                                                                          | Resultado                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Autor                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Avaliação da capacidade aeróbica em indivíduos idosos tratados com e sem produto fermentado de <i>C. sinensis</i>                               | Ensaio clínico randomizado duplo-cego controlado por placebo                | 37 idosos saudáveis                                                                | 3 g/dia - 6 semanas                                                              | Aumento significativo de consumo máximo de oxigênio ( $VO_2 \max$ ) e limiares anaeróbios ( $VO_2 \theta$ )                                                                                                                                                                                                     | Yi; Xi-Zhen; Jia-Shi, 2004    |
| Tratamento de doença crônica do rim                                                                                                             | Revisão de testes randomizados em hospitais ou centros de pesquisa chineses | 22 estudos com 1746 pacientes com doença crônica renal e sem utilização de diálise | 0,66 a 1,98 g/dia                                                                | Diminuição da creatinina sérica, aumento da depuração da creatinina (clearance) e redução da proteinúria de 24 horas - 18 estudos dos 22 apresentaram falhas metodológicas levando à classificação de alto risco de viés pelos autores da revisão, sendo recomendada cautela na interpretação dos resultados    | Zhang <i>et al.</i> , 2014    |
| Efeito imunomodulatório do extrato a partir do micélio                                                                                          | Duplo cego, randomizado e com controle por placebo                          | 79 adultos saudáveis                                                               | 1,68 g/dia - 8 semanas                                                           | Efeito de regulação imunomodulatória maior que no grupo placebo (medido pela atividade das células NK, não foi observada diferença significativa nos outros parâmetros)                                                                                                                                         | Jung <i>et al.</i> , 2019     |
| Eficácia e segurança da utilização de <i>C. sinensis</i> em Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) estágios 1 e 2                            | Revisão sistemática e meta-análise                                          | 15 estudos com 1.238 participantes                                                 | N/A                                                                              | Estudos indicaram melhoria na função pulmonar, resistência ao exercício, qualidade de vida e melhora dos sintomas, porém nenhum dos estudos era controlado por placebo, o que põe em dúvida os resultados relatados                                                                                             | Yu <i>et al.</i> , 2018       |
| Avaliação da segurança do micélio de <i>Cordyceps cicadae</i>                                                                                   | Estudo clínico randomizado                                                  | 49 participantes                                                                   | 1,05 g/dia por 3 meses                                                           | Micélio de <i>C. cicadae</i> produzido por fermentação líquida é seguro e pode ser desenvolvido como um alimento funcional para a saúde                                                                                                                                                                         | Tsai <i>et al.</i> , 2020     |
| Efeito de suplemento alimentar de <i>Rhodiola rosea</i> e <i>Cordyceps sinensis</i> na composição corporal, desempenho e saúde em homens ativos | Estudo clínico estratificado, duplo-cego, controlado por placebo.           | 21 homens jovens ativos                                                            | Em média 930 mg/dia                                                              | Não houve diferença significativa entre suplemento e placebo nesta dosagem e tempo de estudo                                                                                                                                                                                                                    | Kreipke <i>et al.</i> , 2021  |
| Examina os efeitos da bebida de <i>C. militaris</i> na resposta imune em adultos saudáveis                                                      | Estudo clínico controlado por placebo e randomizado                         | 40 adultos (20 homens e 20 mulheres)                                               | 75 mL de suco de fruta com micélio (concentração de 2,85 mg de cordicepina/dose) | Houve diferença significativa de aumento de atividade das células NK no grupo que recebeu o micélio, não houve diferença de índices de açúcar no sangue, lipídios e segurança entre os grupos. O estudo conclui que a bebida pode ser desenvolvida como suplemento imunológico sem toxicidade hepática e renal. | Ontawong <i>et al.</i> , 2024 |

Fonte: a autora.

## 1.6 Bebidas com *C. militaris*

Popularmente, a bebida mais conhecida com *C. militaris* é o chá. Milenarmente utilizado na cultura oriental, o chá é conhecido por seus efeitos energéticos e de saúde na medicina popular. Hoje, porém, além do chá, diversos estudos e patentes trabalham no desenvolvimento de novas bebidas com o cogumelo, sejam elas fermentadas ou não.

Na plataforma *Google Patents*, utilizando os termos “*Cordyceps militaris* AND Beverage” encontram-se 2.596 resultados de patentes, a primeira depositada em 1992 e a mais recente é de setembro de 2024. Lao *et al.* (2019) desenvolveu uma bebida de *C. militaris* fermentada utilizando o pó do cogumelo e água (1:10). Essa mistura passou por uma hidrólise enzimática com pectinase e celulase e depois de inativadas, adicionou-se açúcar mascavo e bactérias lácticas, fermentou-se por 48h e depois as leveduras foram adicionadas para uma nova fermentação de 12h. Essa metodologia resultou em um aumento de compostos voláteis, aumento da acidez e diminuição do amargor. O uso das enzimas também resultou em um aumento da cordicepina e da atividade antioxidante.

A valorização de subprodutos industriais tem se tornado cada vez mais estudada como alternativa para reaproveitamento de materiais que seriam descarte ou que tem valor reduzido no mercado. O estudo de Dai *et al.* (2021) utilizou o soro de soja, um subproduto no beneficiamento do grão que é rico em proteínas, isoflavonas e oligossacarídeos. O *C. militaris* foi colocado para fermentar o soro de soja na temperatura de 26 °C por 8 dias. A fermentação aumentou os níveis de aminoácidos essenciais, fenólicos e flavonoides totais e eliminou os oligossacarídeos no soro da soja.

Uma inovação a partir do chá tradicional foi estudada por Nhan *et al.* (2022), e o chá de *Cordyceps militaris* foi beneficiado em chá instantâneo utilizando secagem por convecção. A melhor formulação foi escolhida levando em conta o conteúdo de cordicepina e o resultado da avaliação sensorial. Os melhores parâmetros foram 40% (m/m) de maltodextrina, 6% (m/m) de extrato de *C. militaris* e 15 h de secagem a 70 °C.

Em conclusão, existem evidências da possibilidade de utilização deste fungo em bebidas e da adição de funcionalidade e diferenças na percepção sensorial. Neste

sentido, os próximos capítulos se dedicarão ao cogumelo, sua caracterização e extração e ao desenvolvimento da bebida fermentada.

## **CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *CORDYCEPS MILITARIS* UTILIZANDO SOLVENTE VERDE ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

### **OPTIMIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS EXTRACTION FROM *Cordyceps militaris* USING GREEN SOLVENT ASSISTED BY ULTRASOUND**

#### **RESUMO**

O *Cordyceps militaris* é um cogumelo comestível e medicinal, tradicionalmente consumido em culturas orientais como na China, Índia e Tailândia. Sua forma mais comum de consumo é pelo chá, mas diversos estudos e patentes vêm desenvolvendo novas bebidas com este fungo de forma a torná-las mais funcionais, saborosas e inovadoras. Trata-se neste capítulo da caracterização do cogumelo (umidade, cinzas, teor de proteínas e lipídeos) e da otimização da extração realizada utilizando Box-Behnken para determinar os melhores parâmetros para obtenção de compostos fenólicos e antioxidantes. Otimizou-se a extração a partir de três parâmetros que são combinados formando 15 experimentos. Estas extrações foram avaliadas em relação aos compostos fenólicos, capacidade antioxidante *in vitro* (FRAP, DPPH e ABTS), cordicepina e adenosina. O modelo final proposto neste trabalho utilizou os dados de fenólicos totais ( $r = 0,98$ ), FRAP ( $r = 0,94$ ) e ABTS ( $r = 0,97$ ). Os resultados de DPPH, cordicepina e adenosina não puderam ser descritos neste modelo pois não tiveram um bom ajuste. A extração ótima foi obtida com uma solução hidroalcolica 15%, amplitude do dispositivo ultrassom de 80% e razão soluto:solvente de 30:1. Nessas condições o teor de compostos fenólicos, ABTS e FRAP foram aumentados em 147,0; 89,0 e 182,4%, respectivamente. O extrato otimizado foi testado quanto a sua toxicidade frente a *Artemia salina*. Como resposta, obteve-se um  $DL_{50}$  de  $1379 \pm 504$   $\mu\text{L/mL}$ , o que classificou o extrato como atóxico. Em conclusão, foi possível otimizar a extração de fenólicos e antioxidantes e o extrato otimizado é apropriado para aplicação em fermentado de maçã, tomando como base os dados de toxicidade.

Palavras-chave: cogumelo; Box-Behnken; compostos fenólicos; cordicepina.

## ABSTRACT

*Cordyceps militaris* is an edible and medicinal mushroom traditionally consumed in Eastern cultures such as China, India, and Thailand. Its most common form of consumption is tea, but various studies and patents have been developing new beverages with this fungus to make them more functional, palatable, and innovative. This chapter addresses the characterization of the mushroom (moisture, ash, protein and lipid content) and the optimization of the extraction performed using Box-Behnken to determine the best parameters for obtaining phenolic and antioxidant compounds. The extraction was optimized based on three parameters combined to form 15 experiments. These extractions were evaluated regarding phenolic compounds, in vitro antioxidant capacity (FRAP, DPPH, and ABTS), cordycepin, and adenosine. The final model proposed in this work utilized the data for total phenolics ( $r = 0.98$ ), FRAP ( $r = 0.94$ ), and ABTS ( $r = 0.97$ ). The results for DPPH, cordycepin, and adenosine could not be described by this model due to lack of fit. The optimal extraction was achieved with a 15% hydroalcoholic solution, an ultrasonic device amplitude of 80%, and a solute-to-solvent ratio of 30:1. Under these conditions, the content of phenolic compounds, ABTS, and FRAP increased by 147.0%, 89.0%, and 182.4%, respectively. The optimized extract was tested for its toxicity against *Artemia salina*. The response yielded an LC<sub>50</sub> of  $1379 \pm 504 \mu\text{L/mL}$ , which classified the extract as non-toxic. In conclusion, it was possible to optimize the extraction of phenolics and antioxidants and the optimized extract is suitable for application in fermented apple, based on the toxicity data.

Keywords: mushroom; Box-Behnken; phenolic compounds; cordycepin.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos, macrofungos da família Agaricaceae, apresentam corpos de frutificação extremamente diversos, variando em tamanho, cores, formatos, esporos, mecanismos de dispersão de esporos e morfologia das lamelas (Assemie; Abaya, 2022). O *Cordyceps militaris*, um fungo entomopatogênico que infecta e consome insetos, destaca-se por sua estrutura filamentosa, altura média de 5 cm e coloração laranja, embora variações genéticas já tenham produzido cepas albinas (Wang *et al.*, 2018). Tradicionalmente consumido em países orientais como China, Índia e Tailândia, este fungo comestível é reconhecido por suas propriedades funcionais, sabor e aroma diferenciados.

Em sua composição, o *C. militaris* contém diversos compostos bioativos de interesse alimentício, como os nucleosídeos cordicepina e adenosina, abordados no capítulo I. Em sua composição destaca-se o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e a ergotioneína, os glicolipídeos (cerebrosídeos), e as glicoproteínas como a lecitina. Estão presentes também o D-manitol, carotenoides como a luteína e a zeaxantina, ergosterol, compostos fenólicos como os ácidos fenólicos e os flavonoides, vitaminas e minerais (Jędrejko; Lazur; Muszyńska, 2021). Esses compostos podem ser de interesse para produtos alimentícios funcionais.

Para maximizar a extração de compostos de interesse, este capítulo dedicou-se a caracterizar e otimizar a extração do cogumelo em solventes verdes, por meio do método de planejamento. O Box-Behnken é um tipo de planejamento experimental de superfície de resposta que fornece informações sobre o efeito que as variáveis do experimento têm sob a resposta encontrada (Box; Behnken, 1960). A utilização do planejamento experimental como ferramenta estatística reduz a variabilidade do processo e permite a utilização de menos recursos, como solvente e matéria-prima, e a aplicação da superfície de resposta auxilia a avaliação de mais de uma variável, mesmo que exista uma interação complexa.

O objetivo deste capítulo foi otimizar a extração do *C. militaris* de forma a obter uma maior quantidade de compostos bioativos, utilizando solventes verdes (água e etanol) e dispositivo ultrassom.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Produção do Cogumelo

O cogumelo utilizado nesta pesquisa foi produzido no laboratório de Processos Fermentativos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Ponta Grossa, de 2021 a 2023. A cepa está depositada na Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (CMRP – Taxonline) sob o código CMRP 5350.

Durante o estudo e a produção ela foi mantida em placa de Petri contendo meio ABD (ágar batata dextrose) a 20 °C e em tubos plásticos de 50 mL com meio líquido de manutenção (seção 2.1.2), utilizando 15 mL de meio, estes mantidos em geladeira a 3 °C.

Para a produção dos cogumelos foi utilizado meio sólido (seção 2.1.1) e para a produção de compostos extracelulares (utilizados posteriormente na fermentação com meio líquido, contida no apêndice I) utilizou-se também o meio líquido de manutenção (seção 2.1.2).

#### 2.2.1.1 *Meio sólido para cultivo dos cogumelos*

Para o meio sólido foi utilizado um meio em arroz integral, propício para produção deste fungo (Hu *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2019). O meio utilizado constitui-se de 100 g de arroz integral (marcas comerciais diversas), 6,2 g de glicose anidra (Dinâmica química, São Paulo, BR), 1,85 g de amido de milho (marcas comerciais diversas), 0,7 g de extrato de levedura (Kasvi, Pinhais Paraná, BR) e 230 mL de água destilada.

Este meio foi autoclavado em 121 °C sob pressão de 1 atm durante 15 min (Alpha life Science, série ALS, Piracicaba, São Paulo, Brasil) resfriado até 25 °C e levado para fluxo laminar (Veco do Brasil, Bioseg 12 tipo A1, Campinas, São Paulo, Brasil) previamente esterilizado com luz UV por 15 min para o inóculo do fungo a partir de uma cultura anterior (armazenada em geladeira à -4 °C). Este meio foi incubado em estufa de demanda biológica de oxigênio à 21 °C (Tecnal, TE-371, Piracicaba, São Paulo, Brasil) no escuro até que o micélio tenha tomado todo o meio, o que variou entre 4 e 15 dias. Depois deste período liga-se a luz (lâmpada fluorescente) por 12

h/d até a completa frutificação (monitora-se visualmente o crescimento do cogumelo até a estabilização do crescimento vertical e preferencialmente antes que o micélio volte a crescer por cima do cogumelo). As duas fases contam com umidificação do ar de ao menos 70% durante todo o processo utilizando umidificador de ar e monitorando com termo-higrômetro (Kasvi, K29, Pinhais, Paraná, Brasil).

#### 2.2.1.2 Meio líquido de manutenção

O *C. militaris* também pode ser cultivado em meio líquido para manter a cepa preservada em temperatura de 3 °C, ou para o crescimento do micélio e produção de compostos extracelulares, a 20 °C Na Tabela 1 pode-se observar a composição do meio de manutenção.

| Tabela 1. Composição do meio de manutenção do <i>C. militaris</i> . |                  |
|---------------------------------------------------------------------|------------------|
| Reagente                                                            | Quantidade (g/L) |
| Glucose                                                             | 10               |
| Nitrato de Sódio                                                    | 2,0              |
| Fosfato de potássio dibásico                                        | 1,0              |
| Fosfato de sódio dibásico                                           | 0,4              |
| Sulfato de magnésio                                                 | 0,5              |
| Extrato de levedura                                                 | 2,0              |

**Fonte:** Adaptado de Milovanović *et al.* (2014), o autor utiliza 2 g de nitrato de amônio, neste estudo foi necessário alterar para nitrato de sódio devido a disponibilidade, porém respeitada as proporções para obtenção do nitrogênio.

As seguintes marcas foram utilizadas no meio de cultivo: glucose (Dinâmica química, SP), nitrato de sódio (Êxodo científica, SP), fosfato de potássio, fosfato de sódio e sulfato de magnésio (Neon reagentes analíticos, SP), extrato de levedura (Kasvi, PR).

Os materiais e os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 121 °C (AV75, Phoenix Equipamentos Científicos, Araraquara, SP) e os procedimentos de repique e inoculação foram conduzidos em câmara de fluxo laminar (FL-14790, Veco do Brasil, Campinas, SP).

## 2.2.2 Caracterização Centesimal do Cogumelo

Após frutificado e colhido, parte do cogumelo foi direcionado à análise de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos; e parte foi seca a 60 °C por 24h e processada em moinho de rotor tipo ciclone (Fortinox, Star FT 51, Piracicaba, Brasil). O cogumelo seco em pó foi armazenado em frasco hermético ao abrigo de luz até a utilização.

### 2.2.2.1 *Análise de Umidade e Cinzas*

A análise de umidade foi realizada pesando 5 g de amostra e realizando a secagem em estufa por convecção (American Lab, AL 102/480, Maringá, Brasil) a 110 °C, por 5 h. Foi realizada a análise de cinzas totais submetendo os mesmos 5 g da amostra à mufla (Quimis, Q318M21, Diadema, Brasil) por 5 h a 550 °C, ambas conforme descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

### 2.2.2.2 *Análise de Proteínas*

A quantificação de proteínas seguiu o método de Kjeldhal (IAL, 2008), onde aproximadamente 0,5 g de amostra foram digeridos com 1,5 g de catalisador ( $\text{CuSO}_4$  e  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , Êxodo Científica) e 6,5 mL de ácido sulfúrico 98% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Êxodo Científica). Essa mistura foi aquecida até se tornar azul-esverdeada e não apresentar mais materiais sólidos não digeridos. Depois este líquido foi levado ao destilador (Marconi, MA036, Piracicaba, São Paulo, Brasil) onde foi adicionado hidróxido de sódio 50% até o escurecimento do líquido. A amostra foi então aquecida, destilada e recolhida em um frasco com 10 mL de ácido bórico 2% e 5 gotas de indicador misto (1 L de solução 0,1% de etanol contendo 25 mL de verde de bromocresol e 5 mL de vermelho de metila). Foi realizada a titulação com ácido clorídrico (HCl) 0,1N. O resultado foi expresso em g/100g.

O fator de conversão é usado para converter a quantidade de nitrogênio de uma amostra para a quantidade total de proteína, pois nem todo nitrogênio na amostra é derivado delas, este valor varia conforme o alimento. O fator utilizado (4,38) baseou-se em estudo de Hsu *et al.* (2004) com o *Cordyceps sinensis*, porém utilizando um fator de conversão genérico para cogumelos. Não foram encontrados fatores de conversão específicos para este cogumelo. Normalmente utilizam-se fatores de conversões mais baixos (próximos a 4, para cogumelos) pois bioprodutos tem um alto teor de nitrogênio não-proteico, como nucleosídeos, alcaloides e quitinas (Xiao *et al.*,

2009), desta forma, para não superestimar o conteúdo proteico convencionou-se utilizar o fator de 4,38 para cogumelos.

#### 2.2.2.3 *Análise de Lipídeos*

A determinação do teor de lipídeos foi realizada por extração com solvente a quente, utilizando extrator Soxhlet (IAL, 2008). Foram pesados 5 g da amostra em um cartucho de papel filtro celulósico e transferidos para o extrator Soxhlet (Tecnal, TE-188, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Foi acoplado ao extrator um balão de fundo chato previamente tarado a 105 °C, e adicionado hexano (ACS Científica) no balão e mantido em aquecimento contínuo em chapa por 8 horas. Retira-se o cartucho com a amostra e pesa-se repetindo a operação até que se encontre peso constante. O cartucho contém então a amostra desengordurada e o balão foi levado para secagem a 105 °C. O valor de lipídeos foi expresso em g/100g.

#### 2.2.3 Testes Preliminares de Extração de Fenólicos e Antioxidantes

Para melhor entender o perfil de extração de compostos fenólicos e antioxidantes foram testadas diferentes temperaturas, solventes e tamanhos de partículas do cogumelo. Este teste objetiva guiar a otimização da extração destes compostos. Foi determinada a concentração de 20 g/L do cogumelo em todas as extrações. Os testes foram realizados com água a 25 °C, para simular uma extração em temperatura ambiente; água a 80 °C, por ser uma temperatura popular usada na extração de diversos tipos de chá e apontada, na maior parte dos casos, como a temperatura ideal para extração com a menor taxa de perda de outros compostos (Chong; Kar-lin nyam, 2021) e uma mistura de água e 7% de etanol de cereais para simular a concentração de etanol presente na sidra. Todas as extrações tiveram tempo de 15 minutos, seguindo Masuda *et al.* (2007). A amostra foi testada não cominuída e cominuída e passada em peneira (Bertel, Caieiras, São Paulo, Brasil) 250 e 450 µm. Além disso, foram testados o uso de banho de ultrassom (Schuster, L200, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil) e dispositivo ultrassônico (Sonics Vibra Cell, 209-A, Connecticut, EUA).

Após extração as amostras foram centrifugadas (Centrifuga, MPW-351, Med. Instruments®, Varsóvia, Polônia) por 15 minutos a 2224 *g*. O sobrenadante foi separado e congelado -20 °C para análises posteriores.

#### 2.2.4 Otimização da Extração de Compostos Bioativos do Cogumelo por Planejamento Experimental Box-Behnken

A otimização dos parâmetros de extração visando maior teor de compostos bioativos foi realizada utilizando-se do planejamento experimental proposto por Box e Behnken (1960). O planejamento fatorial foi construído determinando a porcentagem de etanol no solvente ( $X_1$ ), a amplitude do dispositivo ultrassom ( $X_2$ ) e a razão soluto-solvente ( $X_3$ ), avaliando-os em três níveis (Tabela 2). Assim, o desenho experimental resulta em 15 combinações de tratamento, sendo três repetições do ponto central. Os intervalos estabelecidos para cada variável foram determinados durante o teste inicial de extração, levando em consideração as maiores extrações de compostos fenólicos e antioxidantes. O planejamento experimental foi realizado utilizando o *Software Statistica 8* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Tabela 2. Planejamento experimental Box-Behnken para otimização da extração de compostos bioativos de *C. militaris*

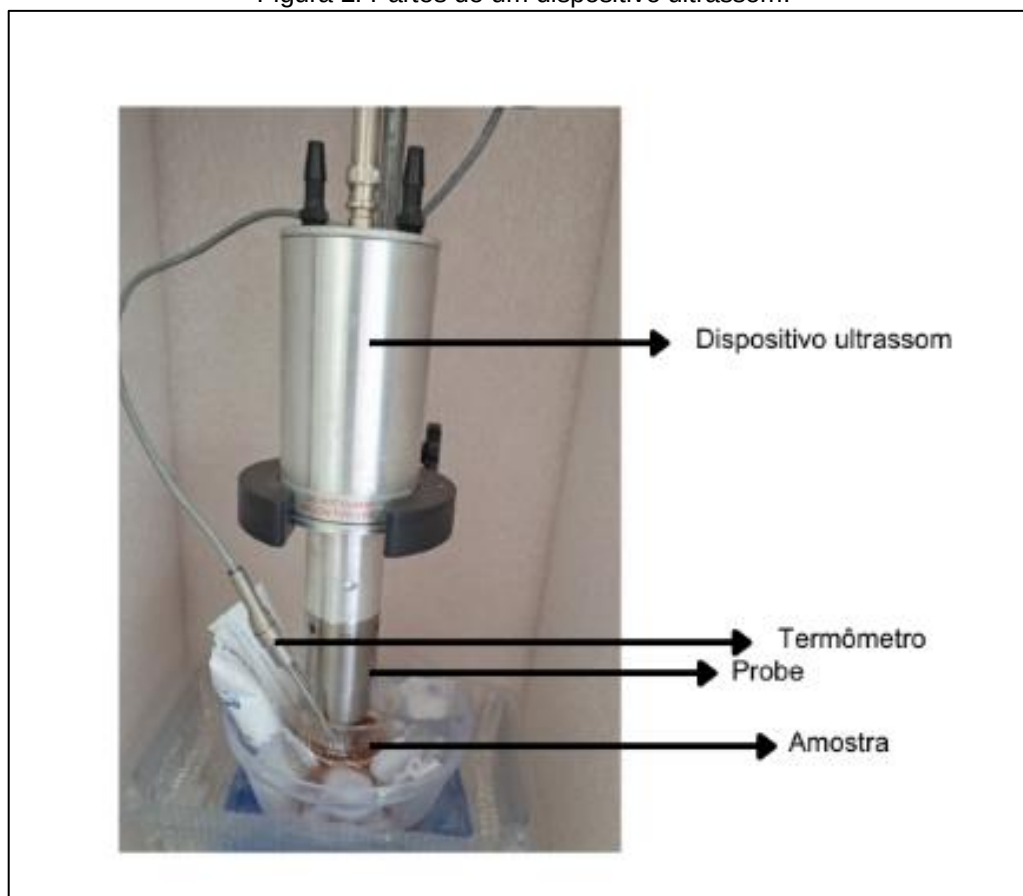
| Experimento | Porcentagem de etanol (v/v) |            | Amplitude (%)    |            | Razão soluto-solvente |            |
|-------------|-----------------------------|------------|------------------|------------|-----------------------|------------|
|             | Valor codificado            | Valor Real | Valor codificado | Valor Real | Valor codificado      | Valor Real |
| 1           | -1                          | 0          | -1               | 50         | 0                     | 20         |
| 2           | +1                          | 50         | -1               | 50         | 0                     | 20         |
| 3           | -1                          | 0          | +1               | 80         | 0                     | 20         |
| 4           | +1                          | 50         | +1               | 80         | 0                     | 20         |
| 5           | -1                          | 0          | 0                | 65         | -1                    | 10         |
| 6           | +1                          | 50         | 0                | 65         | -1                    | 10         |
| 7           | -1                          | 0          | 0                | 65         | +1                    | 30         |
| 8           | +1                          | 50         | 0                | 50         | +1                    | 30         |
| 9           | 0                           | 25         | -1               | 80         | -1                    | 10         |
| 10          | 0                           | 25         | +1               | 50         | -1                    | 10         |
| 11          | 0                           | 25         | -1               | 80         | +1                    | 30         |
| 12          | 0                           | 25         | +1               | 80         | +1                    | 30         |
| 13          | 0                           | 25         | 0                | 65         | 0                     | 20         |
| 14          | 0                           | 25         | 0                | 65         | 0                     | 20         |
| 15          | 0                           | 25         | 0                | 65         | 0                     | 20         |

O tempo foi fixado em 15 minutos e a temperatura foi programada no dispositivo ultrassom (SONICS Vibra-Cell modelo VCX750, Newtown, USA) para não

ultrapassar 30 °C, sendo mantida resfriada com gelo, conforme a Figura 2. O dispositivo operou com 750 W de potência, 20 kHz de frequência e probe de 25 mm.

Após extração as amostras foram centrifugadas (Centrifuga, MPW-351, Med. Instruments®, Varsóvia, Polônia) por 15 minutos a 2224 *g*. O sobrenadante foi separado e congelado -20 °C para análises posteriores.

Figura 2. Partes de um dispositivo ultrassom.



**Fonte:** autoria própria

## 2.2.5 Análises de Compostos Fenólicos e Antioxidantes

Nesta sessão estão descritas as análises de compostos fenólicos e antioxidantes realizadas nos extratos e posteriormente nos fermentados alcoólicos de maçã (capítulo III).

### 2.2.5.1 *Análise de compostos fenólicos totais (TFC)*

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado com base no método de Folin-Ciocalteu proposto por Singleton e Rossi (1965). O ensaio ocorre em tubos de ensaio com adição de água destilada (8,4 mL); 100 µL de amostra e 500 µL de Folin-

Ciocalteu (0,2 mol/L). Agitam-se os tubos (Vórtex, Vision Scientific®, Daejeon, Coreia do Sul) por 30 segundos e 3 minutos após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu (Êxodo Científica) os tubos recebem 1 mL de Carbonato de sódio (1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Dinâmica Química). Acomodam-se os tubos na ausência de luz durante 1 hora. Realiza-se a leitura desta reação em espectrofotômetro de microplaca (Epoch, Synergy-BioTek®, Winooski, EUA), no comprimento de onda de 765 nm. Para realização do branco, foram feitas análises com 100  $\mu\text{L}$  de água destilada no lugar da amostra. Para a curva de quantificação o ácido gálico foi determinado como controle e concentrações de 20 a 200 mg/L formam a curva para comparação das amostras ( $y = 0,0007x + 0,0043$ ;  $R^2 = 0,9939$ ).

#### 2.2.5.2 *Análise de antioxidantes pelo método de ABTS*

O método de ABTS quantifica colorimetricamente a captura do cátion 2,2-azino-bis (3-ethylbenzot hiazoline-6-sulfonic acid) (Re *et al.*, 1999). O reagente é preparado com 3 mL de solução ABTS (7 mmol/L) e 3 mL de solução de persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). Acondiciona-se a mistura em ambiente ao abrigo de luz durante 16 horas. Após, 4 mL do reagente ABTS são misturados com água até o volume de 200 mL em balão volumétrico. A absorbância desta solução deve ser superior a 0,700 quando lida em 734 nm. Em microplaca adicionam-se 20  $\mu\text{L}$  de amostra com 280  $\mu\text{L}$  do reagente ABTS. Esta mistura é mantida em repouso na ausência de luz por 30 minutos. A leitura das amostras foi realizada nas mesmas condições e equipamento utilizado para a calibração do reagente. Para a curva utilizou-se o composto Trolox (50 a 350  $\mu\text{mol/L}$ ) como padrão ( $y = 0,2077x - 12,743$ ;  $R^2 = 0,9951$ ).

#### 2.2.5.3 *Análise de antioxidantes pelo método de FRAP*

Essa metodologia quantifica a redução do íon férrico presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Benzie; Strain, 1996). Em microplaca adicionam-se 10  $\mu\text{L}$  de amostra e 290  $\mu\text{L}$  de reagente de FRAP. Após 30 minutos de repouso na ausência de luz, a leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro de microplaca, em 595 nm. O padrão Trolox (100 a 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) foi utilizado para a curva padrão ( $y = 0,0012x + 0,1231$ ;  $R^2 = 0,9989$ ).

#### 2.2.5.4 *Análise de antioxidantes pelo método de DPPH*

Este método de Brand-Williams, Couvelier e Berset (1995), quantifica a captura do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. O ensaio ocorre em tubos de ensaio adicionados de amostra (50 µL) e 1,9 mL de solução DPPH. Os tubos tampados foram agitados em vórtex por 30 segundos e então mantidos no escuro por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca a 517 nm. Assim como nas demais determinações antioxidantes, o padrão Trolox (100 a 700 µmol/L) foi utilizado para a curva de quantificação ( $y = 0,0516x - 1,7232$ ;  $R^2 = 0,998$ ).

#### 2.2.6 Quantificação de Cordicepina e Adenosina em UHPLC/MS

Todos os reagentes utilizados nesta sessão são de grau HPLC. As análises descritas aqui foram realizadas nos extratos e nos meios líquidos. As amostras foram descongeladas e então filtradas em filtro Politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22 µm e 13mm (Filtrilo, Colombo, PR, Brasil). A quantificação foi realizada em LC/MS-MS (Xevo Tdq Triplo quadrupolo, Waters, Milford, MA, Estados Unidos da América).

A metodologia para análise de espectrometria de massas foi otimizada a partir do estudo de Fu, Chen e Cao (2018). Utilizou-se a coluna Acquity UPLC HSST3 (2,1mm x 5 mm x 1,8 µm). Os parâmetros usados foram: ionização positiva, voltagem capilar 4kV, voltagem do cone 35V, temperatura de dessolvatação 350°C, dessolvatação 550 L/h, cone 10 L/min, energia de colisão 20, o volume de injeção foi de 2 µL e a vazão 0,3 µL/min.

A fase líquida foi composta de fase A: água ultrapura e B: metanol. As condições utilizadas para o gradiente foram de 0 a 3 minutos em 83% de A e 17% de B, de 3 a 4 subindo para 100% de A, de 4 a 5 minutos em 100% de A e de 5 a 10 minutos novamente acondicionando em 83% de A e 17% de B. Para identificação dos compostos foram utilizadas substâncias padrão (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) e a identificação pela fragmentação dos íons, sendo a cordicepina observada pelo íon precursor para a cordicepina foi m/z 252 com monitoramento do fragmento 136; e para a adenosina m/z 268 com fragmento 236.

### 2.2.7 Teste de Toxicidade em *Artemia salina*

Este método (McLaughlin, Chang e Smith, 1993) consiste no uso de nauplios de *Artemia salina* para avaliação de toxicidade de extratos. Determina-se a DL<sub>50</sub> (dose letal para 50% dos nauplios) em µL/mL. Os cistos da *A. salina* foram adquiridos em comércio local (Hanimal, Joinville, SC). Foram pesados (0,250 g) e colocados em 1 L de solução salina (30 g/L) em frasco de capacidade de 2 L. Estes cistos foram incubados sob luz fluorescente constante e mantidos em temperatura ambiente (25 - 30°C) até a eclosão (24 - 48h). Após este período os nauplios foram coletados para utilização no ensaio.

As soluções foram preparadas com extrato e água salina nas concentrações de 10; 20; 25; 31,25; 42 e 50 mL/L, adicionalmente foi preparado um controle negativo utilizando apenas água salina 30 g/L.

Foram transferidos então 10 nauplios para cada poço de uma microplaca de 96 poços, utilizando uma micropipeta. Adicionou-se 100 µL do extrato nas devidas diluições e 200 µL de água salina para manter o volume constante, completando assim o volume da placa. A placa foi incubada em temperatura ambiente (25 – 30 °C) por 24h.

Utilizando-se de estereoscópio (Estéreo Zoom LAB SZ, Laborana, São Paulo, SP), realizou-se a contagem de nauplios mortos e vivos em cada poço. A análise estatística foi realizada no software *Minitab* (Minitab LLC, Pensilvania, USA) utilizando análise por probito. Esta análise modela variáveis dependentes binárias, ou seja, que assumem apenas dois valores, no caso da análise de toxicidade: mortos ou vivos. Desta forma, determina-se a probabilidade de um evento ocorrer em função da concentração do extrato analisado e assim determina-se a DL<sub>50</sub>.

### 2.2.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos nas análises foram expressos como média e desvio padrão. O planejamento experimental Box-Behnken e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software Statistica 8* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). A força de correlação entre os parâmetros foi analisada pelos produtos de Pearson (r). O teste de toxicidade foi avaliado utilizando o software *Minitab* (Minitab LLC, Pensilvania, USA) com análise por probito.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Caracterização do Cogumelo

Os dados obtidos em relação a caracterização do cogumelo constam na Tabela 3. Diferentes cepas e espécies do cogumelo, demonstram grande variabilidade de suas características. Pavleen *et al.* (2024) avaliou a composição do *C. militaris* e encontrou um valor de umidade de 85,48%, um teor de proteína de 23,02% alinhados ao encontrado nesta pesquisa, porém há uma diferença no teor de lipídeos (3,84%) e de cinzas (2,06%). Essas diferenças podem ser justificadas pela diferença de cepa (Huang *et al.*, 2006), de meio de cultivo (Raethong, *et al.*, 2020) e período de colheita (Wen *et al.*, 2014), por exemplo. Na Figura 3 observa-se uma frutificação do cogumelo realizada em meio sólido.

Tabela 3. Resultados das análises físico-químicas dos cogumelos

| Análise                            | Resultado (%) $\pm$ Desvio Padrão |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| Umidade                            | 85,42 $\pm$ 1,51                  |
| Cinzas*                            | 7,39 $\pm$ 0,75                   |
| Proteínas*                         | 15,31 $\pm$ 0,67                  |
| Lipídeos*                          | 1,21 $\pm$ 0,01                   |
| Carboidratos e fibras alimentares* | 76,06 $\pm$ 2,94                  |

\*Resultados expressos em porcentagem em base seca

Figura 3. *Cordyceps militaris* em crescimento em meio sólido



Fonte: autoria própria (2022).

### 2.3.2 Análises dos Extratos de *C. militaris*

Conforme relatado na metodologia, foram realizados pré-testes de extração (Figura 4) a fim de melhor guiar a otimização da extração. Na Tabela 4, estão os resultados para os diferentes tratamentos realizados durante a extração.

Young *et al.* (2022) avaliou o teor de compostos fenólicos e antioxidantes (DPPH e ABTS) no micélio e no corpo frutificado do *C. militaris*. No estudo, chegou-se à quantidade de  $7,66 \pm 1,10$  mgEAG/g no cogumelo e  $15,55 \pm 1,10$  mgEAG/g no micélio. Em relação aos antioxidantes, os pesquisadores expressaram as quantidades em EC50, que é uma medida que representa a quantidade necessária para inibir 50% dos radicais. No estudo, foi encontrado uma quantidade de  $3,81 \pm 0,70$  mg/mL para o DPPH e  $1,13 \pm 0,05$  mg/mL para o ABTS.

Tabela 4. Resultados de teor de compostos fenólicos totais e antioxidantes nos diferentes extratos

| Amostra  | CFT (mgEAG/g)        | DPPH ( $\mu\text{molET/g}$ ) | ABTS ( $\mu\text{molET/g}$ ) |
|----------|----------------------|------------------------------|------------------------------|
| AF       | $8,10^c \pm 0,65$    | $15,95^{bc} \pm 3,11$        | $13,39^d \pm 0,18$           |
| AQ       | $9,96^b \pm 0,65$    | $17,50^c \pm 1,32$           | $20,92^b \pm 0,06$           |
| AA       | $9,20^{bc} \pm 0,14$ | $13,37^b \pm 1,65$           | $12,46^e \pm 0,45$           |
| AABU     | $19,15^d \pm 0,22$   | $22,60^a \pm 3,12$           | $19,43^c \pm 0,06$           |
| AA 250BU | $19,67^d \pm 0,38$   | $22,87^a \pm 2,58$           | $21,27^f \pm 0,10$           |
| AA 250DU | $19,91^d \pm 0,30$   | $22,26^a \pm 3,59$           | $21,34^f \pm 0,06$           |
| AA 450DU | $21,24^a \pm 0,57$   | $7,82^d \pm 0,93$            | $22,98^a \pm 0,06$           |

**Nota:** AF: extração com água destilada a 25 °C; AQ: extração com água destilada a 80 °C; AA: extração hidroalcóolica a 7% e 25 °C; AABU: extração hidroalcóolica em banho ultrassom; AA250BU: extração hidroalcóolica 7% cominuída 250 mm e com banho ultrassom; AA250DU: extração hidroalcóolica 7% cominuída 250 mm e com dispositivo ultrassom; AA450DU: extração hidroalcóolica 7% cominuída 450 mm e com dispositivo ultrassom.

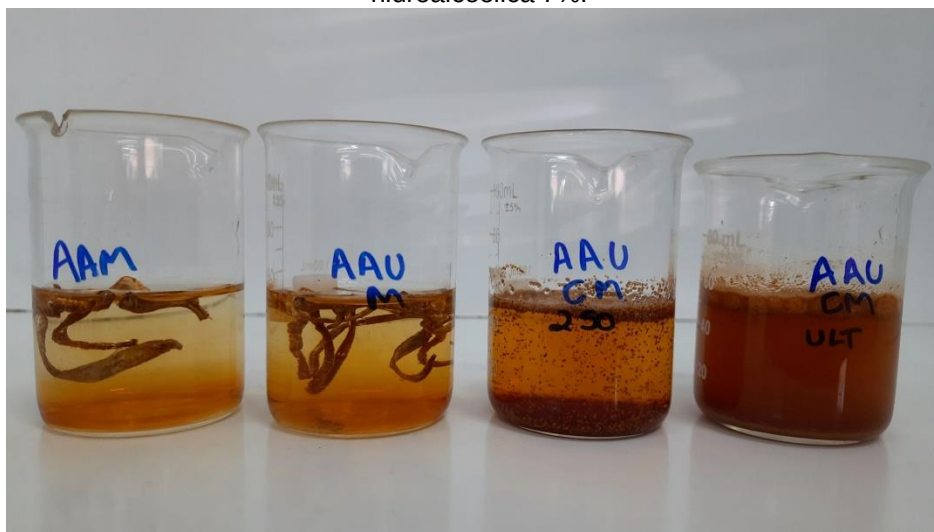
Em comparação com os dados obtidos pela pesquisa desta tese, os compostos fenólicos no extrato têm valores próximos quando não tratados em banho ou dispositivo ultrassom, nem cominuídos. Porém, comparado ao tratamento com 450 mm e uso de dispositivo ultrassom, o resultado obtido neste estudo é quase três vezes maior. Em relação aos antioxidantes, o EC50 encontrado para o DPPH das extrações é em média  $0,266 \pm 0,003$  mg/mL, isso significa que é necessário 14 vezes menos extrato para inativar 50% do DPPH quando comparado ao estudo de Young *et al.* (2022).

Em relação ao ABTS, o EC50 é em média  $0,072 \pm 0,003$  mg/mL. Este valor é 15 vezes menor que o encontrado por Young *et al.* (2022). Em resumo, as

extrações realizadas neste trabalho foram eficazes na retirada de compostos fenólicos e antioxidantes de dentro das células do fungo. A diferença entre os valores pode se dar também pela diferença de cepas de *Cordyceps* utilizadas e pelos métodos de cultivo.

Entre as extrações analisadas, os melhores resultados foram obtidos utilizando o cogumelo cominuído 450 mm, utilizando água e álcool de cereais 7% e dispositivo ultrassom. Desta forma, os próximos passos levaram em conta estes parâmetros a fim de otimizar a extração.

Figura 4. Imagem ilustrativa das extrações com cogumelo inteiro ou cominuído em solução hidroalcóolica 7%.



Nota: AAM: extração com água e álcool 7%; AAU: extração com água e álcool em banho ultrassom; AAUCM250: água e álcool 7% em dispositivo ultrassom e cogumelo cominuído 250 mm; AAUCMULT: água e álcool 7% em dispositivo ultrassom e cogumelo cominuído 450 mm.

### 2.3.3 Otimização da Extração Utilizando Box-Behnken

Após realizadas as 15 extrações planejadas pelo método de box-behnken, realizou-se a análise de compostos fenólicos e antioxidantes (ABTS, DPPH e FRAP). Os resultados encontram-se na Tabela 5.

Observando a Tabela 5 e comparando com os dados de cada experimento, pode-se observar que para os compostos fenólicos e antioxidantes (com exceção do DPPH), as piores extrações se encontram nos experimentos 5, 6, 9 e 10, que são as extrações com menor razão soluto-solvente. Já no caso do DPPH, as melhores extrações são a 5 e a 6, que tem entre 0 e 50% de etanol, 65% de amplitude e razão soluto:solvente 10.

Tabela 5. Concentração de compostos fenólicos e antioxidantes dos extratos de *C. militaris*

| Amostra | FT<br>(mgEAG/g)  | ABTS<br>( $\mu\text{molEqT/g}$ ) | FRAP<br>( $\mu\text{molEqT/g}$ ) | DPPH<br>( $\mu\text{molEqT/g}$ ) | Cordicepina<br>(mg/g) | Adenosina<br>(mg/g) |
|---------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| 1       | 13,86 $\pm$ 0,66 | 30,87 $\pm$ 2,56                 | 31,88 $\pm$ 1,42                 | 9,39 $\pm$ 0,10                  | 1,11 $\pm$ 0,11       | 1,05 $\pm$ 0,03     |
| 2       | 11,75 $\pm$ 0,25 | 27,82 $\pm$ 1,08                 | 25,60 $\pm$ 1,15                 | 10,87 $\pm$ 0,26                 | 1,60 $\pm$ 0,04       | 1,00 $\pm$ 0,03     |
| 3       | 13,14 $\pm$ 0,21 | 30,13 $\pm$ 1,05                 | 32,03 $\pm$ 1,34                 | 10,95 $\pm$ 1,12                 | 1,20 $\pm$ 0,05       | 1,09 $\pm$ 0,02     |
| 4       | 11,63 $\pm$ 0,31 | 24,18 $\pm$ 0,90                 | 23,91 $\pm$ 0,90                 | 9,50 $\pm$ 0,30                  | 2,07 $\pm$ 0,27       | 1,12 $\pm$ 0,02     |
| 5       | 7,58 $\pm$ 0,12  | 21,30 $\pm$ 0,48                 | 27,76 $\pm$ 1,37                 | 12,12 $\pm$ 0,42                 | 0,21 $\pm$ 0,00       | 0,18 $\pm$ 0,02     |
| 6       | 7,14 $\pm$ 0,34  | 18,60 $\pm$ 0,54                 | 19,38 $\pm$ 0,79                 | 11,17 $\pm$ 0,56                 | 0,41 $\pm$ 0,00       | 0,23 $\pm$ 0,01     |
| 7       | 15,15 $\pm$ 0,32 | 34,61 $\pm$ 0,73                 | 32,24 $\pm$ 0,77                 | 8,48 $\pm$ 0,23                  | 1,41 $\pm$ 0,02       | 0,27 $\pm$ 0,01     |
| 8       | 13,66 $\pm$ 0,31 | 30,98 $\pm$ 1,39                 | 24,90 $\pm$ 0,71                 | 8,04 $\pm$ 0,17                  | 1,47 $\pm$ 0,05       | 0,25 $\pm$ 0,01     |
| 9       | 6,86 $\pm$ 0,07  | 20,17 $\pm$ 0,93                 | 26,13 $\pm$ 1,26                 | 9,61 $\pm$ 0,11                  | 1,33 $\pm$ 0,09       | 1,12 $\pm$ 0,06     |
| 10      | 7,00 $\pm$ 0,22  | 21,36 $\pm$ 0,48                 | 26,39 $\pm$ 0,43                 | 9,93 $\pm$ 0,04                  | 1,41 $\pm$ 0,04       | 1,14 $\pm$ 0,00     |
| 11      | 14,86 $\pm$ 0,68 | 33,44 $\pm$ 1,51                 | 28,38 $\pm$ 0,48                 | 7,56 $\pm$ 0,32                  | 0,70 $\pm$ 0,01       | 0,26 $\pm$ 0,04     |
| 12      | 14,27 $\pm$ 0,59 | 33,51 $\pm$ 0,82                 | 30,28 $\pm$ 0,67                 | 8,47 $\pm$ 0,52                  | 0,66 $\pm$ 0,01       | 0,19 $\pm$ 0,03     |
| 13      | 11,69 $\pm$ 0,15 | 27,75 $\pm$ 1,00                 | 27,45 $\pm$ 0,80                 | 9,12 $\pm$ 0,71                  | 0,28 $\pm$ 0,01       | 0,10 $\pm$ 0,03     |
| 14      | 12,10 $\pm$ 0,46 | 29,22 $\pm$ 1,27                 | 26,98 $\pm$ 1,27                 | 7,80 $\pm$ 0,19                  | 0,30 $\pm$ 0,01       | 0,07 $\pm$ 0,01     |
| 15      | 11,76 $\pm$ 0,28 | 27,83 $\pm$ 1,34                 | 27,80 $\pm$ 0,65                 | 7,63 $\pm$ 0,31                  | 0,28 $\pm$ 0,03       | 0,07 $\pm$ 0,02     |

Nota: os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. FT: Fenóis totais; AG: ácido gálico; T: trolox;

Em relação a cordicepina e a adenosina, as melhores extrações para ambos os compostos se encontram nos experimentos 1, 2, 3, 4, 9 e 10. Nestes experimentos, a porcentagem de etanol, a amplitude e a razão soluto:solvente abarcaram diferentes combinações nos diferentes níveis determinados, o que significa que as variáveis selecionadas não explicam completamente o aumento ou diminuição dos valores resultantes, justamente por isso, estes não entraram para a otimização, como explicado nos próximos parágrafos.

Os modelos propostos na análise de regressão múltipla para as variáveis de resposta avaliadas (compostos fenólicos, ABTS e FRAP) foram significativos ( $p \leq 0,05$ ) e estão apresentados na Tabela 6. Os resultados obtidos para DPPH, cordicepina e adenosina não puderam ser descritos pelo modelo sugerido, pois a falta de ajuste de dados foi significativa ( $P \text{ lack of fit} \leq 0,05$ ), os baixos valores de  $R^2$  ajustados também corroboraram para a exclusão destes dados na otimização.

Os dados da Tabela 6 exibem que os fatores mais importantes para a otimização foram a razão soluto:solvente e a porcentagem de etanol. Apenas para o FRAP a amplitude do dispositivo ultrassom apareceu como uma variável importante.

Tabela 6. Efeito das variáveis independentes sobre a concentração de compostos fenólicos e antioxidantes.

| Variáveis respostas                  | Fatores                   | Coef. de Regressão | Erro padrão | t-valor | p-valor | -95% de confiança | +95% de confiança |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------|---------|---------|-------------------|-------------------|
| Compostos fenólicos totais (mgEAG/g) | Constante                 | 12,28              | 0,17        | 70,42   | 0,00    | 11,89             | 12,66             |
|                                      | X1*                       | -0,69              | 0,16        | -4,25   | 0,00    | -1,05             | -0,33             |
|                                      | X3***                     | 3,67               | 0,16        | 22,51   | 0,00    | 3,31              | 4,03              |
|                                      | X3X3                      | -1,46              | 0,24        | -6,12   | 0,00    | -1,99             | -0,94             |
|                                      | R <sup>2</sup>            | 0,976              |             |         |         |                   |                   |
|                                      | ajustado<br>P lack of fit | 0,170              |             |         |         |                   |                   |
| ABTS (µmolET/g)                      | Constante                 | 28,26              | 0,38        | 74,06   | 0,00    | 27,42             | 29,10             |
|                                      | X1                        | -1,92              | 0,36        | -5,37   | 0,00    | -2,70             | -1,13             |
|                                      | X3                        | 6,39               | 0,36        | 17,90   | 0,00    | 5,60              | 7,18              |
|                                      | X3X3                      | -1,51              | 0,52        | -2,89   | 0,01    | -2,66             | -0,36             |
|                                      | R <sup>2</sup>            | 0,962              |             |         |         |                   |                   |
|                                      | ajustado<br>P lack of fit | 0,441              |             |         |         |                   |                   |
| FRAP (µmolET/g)                      | Constante                 | 26,65              | 0,35        | 75,34   | 0,00    | 25,87             | 27,42             |
|                                      | X1                        | -3,76              | 0,33        | -11,38  | 0,00    | -4,49             | -3,04             |
|                                      | X2X2**                    | 1,43               | 0,48        | 2,95    | 0,01    | 0,36              | 2,50              |
|                                      | X3                        | 2,02               | 0,33        | 6,10    | 0,00    | 1,29              | 2,74              |
|                                      | R <sup>2</sup>            | 0,925              |             |         |         |                   |                   |
|                                      | ajustado<br>P lack of fit | 0,149              |             |         |         |                   |                   |

Nota: \* X1 corresponde a porcentagem de etanol (v/v); \*\* X2 corresponde a porcentagem de amplitude do dispositivo ultrassom; \*\*\* X3 corresponde a razão soluto-solvente; Os termos repetidos (X2X2 e X3X3) correspondem aos termos quadráticos

Quando os pontos lineares são significantes ( $p < 0,05$ ) significa, de modo simplificado, que o aumento ou a diminuição deste fator tem um efeito direto consistente na resposta final. Quando um termo quadrático tem significância, significa que o efeito deste fator faz uma “curva” ou pico, ou seja, ao chegar em um máximo ele muda de direção. Então com um efeito quadrático significativo o ponto ótimo não aumenta linearmente, mas aumenta (ou diminui, dependendo se a resposta for negativa ou positiva) até um certo ponto, e a partir deste ponto a resposta pode ter um efeito contrário, levando a diminuição da resposta.

Em relação a este estudo, os fatores lineares X1 e X3 foram significantes em todas as respostas (fenóis totais, ABTS e FRAP), o que significa que o ponto ótimo para X1 (porcentagem de etanol) e X3 (razão soluto-solvente) estarão nos máximos testados neste planejamento. Porém, para os fenólicos totais e para o ABTS, como X3X3 (o termo quadrático da razão soluto-solvente) foi significativo, este máximo tem um limite para a otimização. Na resposta para o FRAP o termo quadrático X2X2 foi

significante. É possível interpretar que para o FRAP, aumentar a amplitude tem um efeito positivo, porém após 80%, pode ter um efeito contrário. Isso se refere às respostas individualmente.

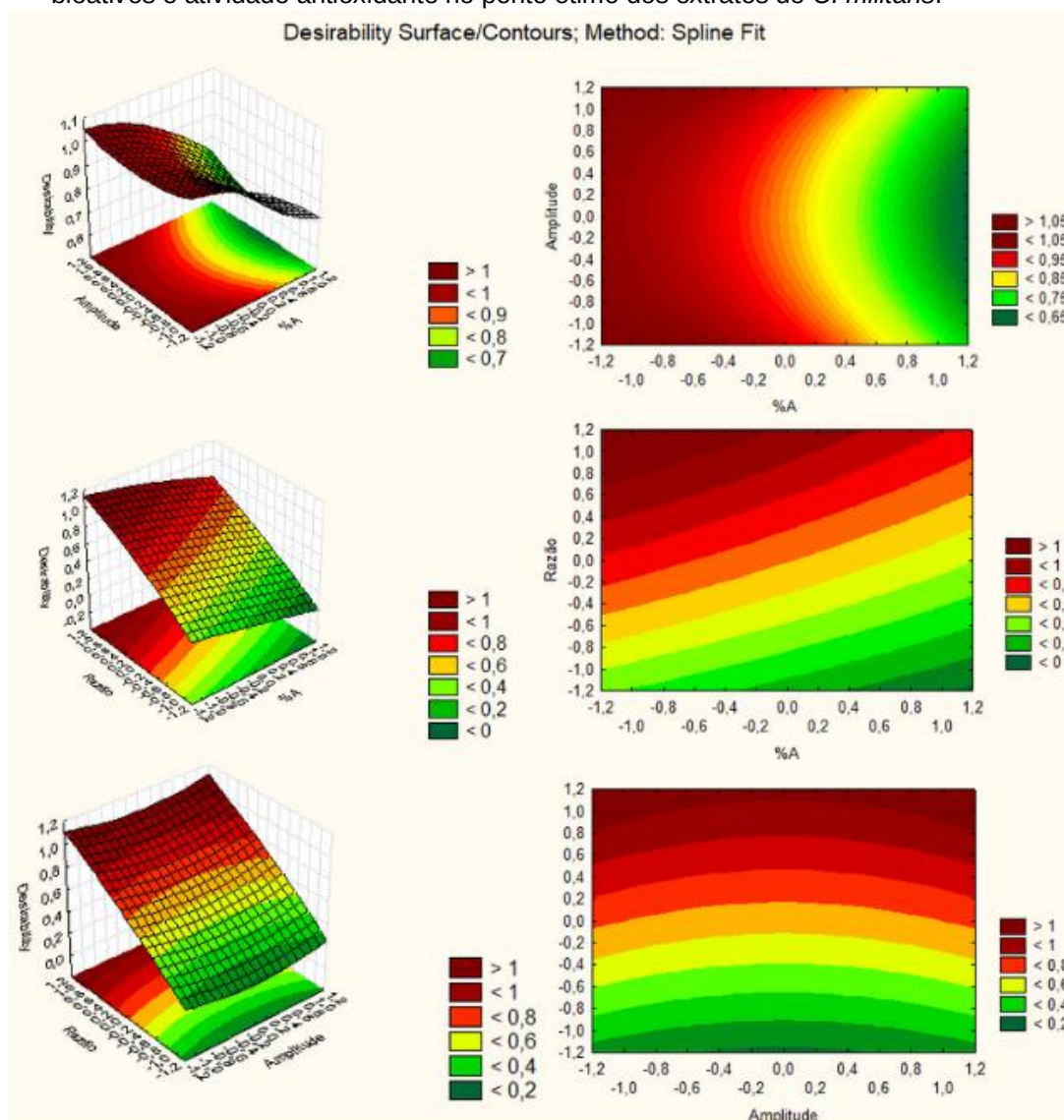
O ponto ótimo das variáveis para a extração foi determinado visando obter o maior rendimento em compostos fenólicos e antioxidantes (ABTS e FRAP). Os resultados otimizados por meio da superfície de resposta (Figura 5) sugerem a aplicação dos maiores níveis testados de amplitude (80%) e de razão soluto:solvente (1:30); para a porcentagem de etanol o sugerido foi 15%. O software (Statistica 8.0) utiliza modelos matemáticos para cada resposta individual (Fenois, ABTS e FRAP) e ajusta entre esses, um modelo para extração aumentada das três respostas.

É realizado então um balanceamento dos fatores  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ . Para os fenóis totais e o ABTS o  $X_3$  (razão soluto-solvente) é um termo linear e quadrático significativo. O termo quadrático sugere um limite, mas se o termo linear é dominante, o software pode optar pela maximização do termo linear  $X_3$  (+1), para otimização da resposta. Para o FRAP, o termo linear  $X_3$  também é significativo e positivo, o que sugere que o aumento da razão aumenta a resposta. Então, a decisão geral do software é a de que aumentar o fator  $X_3$  é benéfico para todas as respostas.

No caso do termo  $X_2$  (amplitude), para o FRAP o termo quadrático é significativo, o que significa que existe uma amplitude ótima, mesmo assim, o software determinou, que a máxima amplitude testada (+1) é próxima o suficiente do ponto ótimo para o FRAP e não prejudica as outras respostas. Para os compostos fenólicos e ABTS o termo  $X_2$  não é significativo então o seu valor não afeta de forma direta as respostas. A decisão foi por definir o ótimo de  $X_2$  no máximo para favorecer a resposta do FRAP.

O termo  $X_1$  (porcentagem de etanol), está entre 0 e +1 pois apesar de ter um efeito linear significativo nas 3 respostas o software pode ter entendido que colocar o fator  $X_1$  no máximo não beneficia o suficiente a otimização para justificar o aumento ou pode afetar negativamente uma das respostas (percebido pelo software por meio das interações ou pelas restrições do modelo), sendo assim, o valor ótimo encontrado esteve entre 0 e +1. Normalmente, os softwares estatísticos utilizam funções de desejabilidade ou métodos similares para combinarem as respostas em um critério de otimização (Ramírez-Brewer; Quintana; García-Zapateiro, 2024).

Figura 5. Superfície de resposta e gráficos de contorno mostrando os efeitos das variáveis independentes (porcentagem de etanol, amplitude e razão) sobre a concentração de compostos bioativos e atividade antioxidante no ponto ótimo dos extratos de *C. militaris*.



Para validação do modelo desenvolvido para compostos fenólicos totais, ABTS e FRAP o extrato nas condições otimizadas foi testado. Os valores preditos para cada parâmetro em condições ótimas e os resultados obtidos experimentalmente estão contidos na Tabela 7. O resultado experimental para ABTS está contido em um intervalo de 95% de confiança, e os resultados de fenóis totais e FRAP tiveram um erro em relação ao valor predito de 10% e 7,4% respectivamente, considerando o valor do desvio padrão é possível a validação do modelo.

Tabela 7. Valores preditos e experimentais das variáveis obtidas no ponto ótimo de extração do *C. militaris*.

| Variável resposta       | Valores |                   |                   | Observado    |
|-------------------------|---------|-------------------|-------------------|--------------|
|                         | Predito | -95% de confiança | +95% de confiança |              |
| Fenóis totais (mgEAG/g) | 15,76   | 15,25             | 16,27             | 17,30 ± 1,61 |
| ABTS (μmolET/g)         | 35,23   | 33,66             | 36,79             | 34,10 ± 0,27 |
| FRAP (μmolET/g)         | 32,35   | 31,39             | 33,31             | 34,66 ± 2,76 |

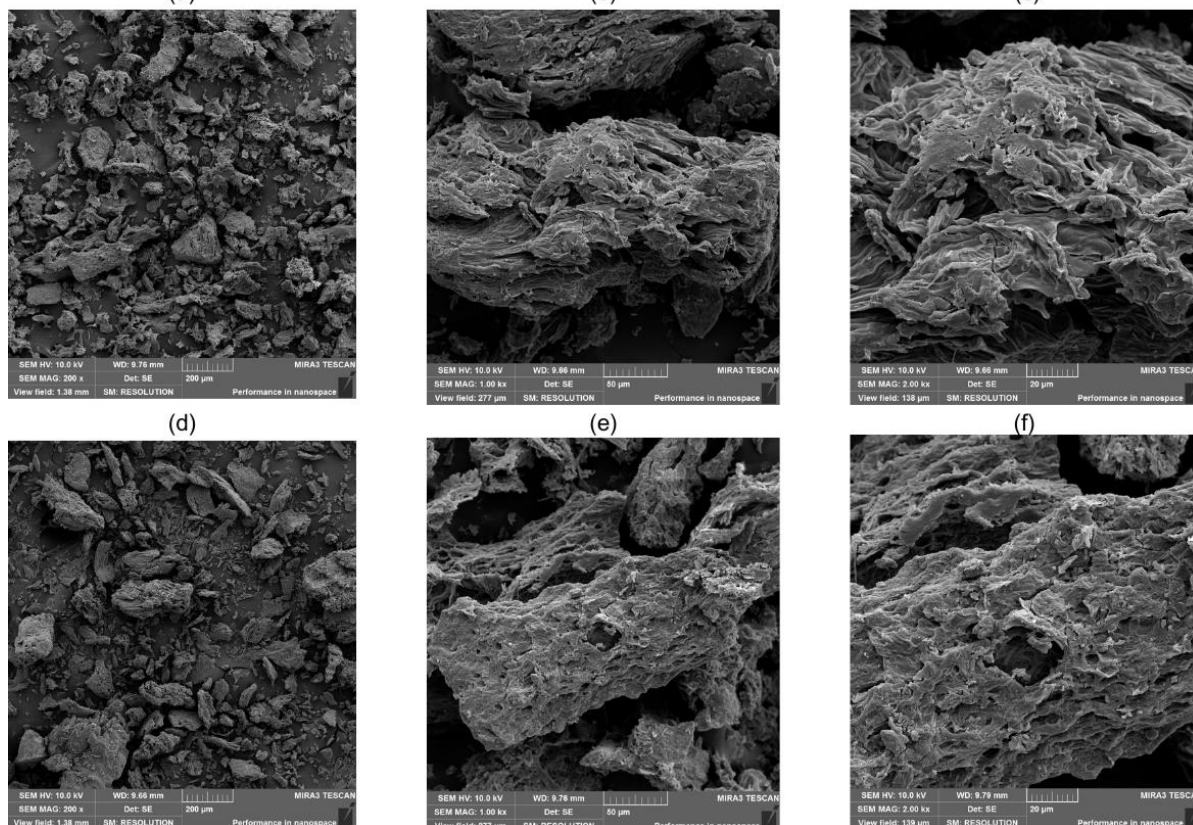
### 2.3.3.1 Toxicidade do extrato otimizado

O extrato otimizado foi submetido ao ensaio de toxicidade com *Artemia salina*. Neste ensaio obteve-se um DL<sub>50</sub> de 1379 ± 504 μL/mL. Os valores de referência foram estabelecidos por McLaughlin, Chang e Smith (1993) em que valores acima de 500 μg/mL são considerados de baixa toxicidade, valores entre 100 e 500 μg/mL são considerados de toxicidade moderada e até 100 μg/mL são considerados de alta toxicidade; e o estabelecido por Meyer *et al.* (1982) que acima de 1000 μg/mL são considerados sem toxicidade para *A. salina*. Dentro destes valores de referência pode-se considerar que o extrato otimizado é atóxico e, portanto, propício para a utilização em produtos alimentícios.

### 2.3.3.2 Imagens de microscopia eletrônica

Nesta seção estão dispostas as imagens obtidas em microscópio do tipo FEG. A Figura 6 é um comparativo entre o cogumelo seco cominuído antes (1ª linha) e após a extração (2ª linha). Nota-se que no cogumelo seco cominuído a estrutura do cogumelo é mais coesa, enquanto após a extração em ultrassom, observa-se o efeito de cavitação, com maior formação de poros nas estruturas do cogumelo. Isso acontece pois o dispositivo ultrassom forma poros na matéria-prima que rompe as células e libera seu conteúdo interno.

Figura 6. Comparativo entre as estruturas do cogumelo seco cominuído pré e pós-extração.



Nota: (a), (b) e (c) correspondem às imagens do cogumelo seco cominuído nos aumentos 200, 1000 e 2000, respectivamente; (d), (e) e (f) correspondem às imagens do cogumelo seco cominuído pós extração nos aumentos 200, 1000 e 2000, respectivamente.

## 2.4 Conclusão

A partir das análises realizadas, foi possível otimizar a extração de compostos fenólicos e antioxidantes a partir do pó do cogumelo do *C. militaris*. Foi verificado a partir do planejamento experimental fatorial Box-Behnken que os melhores parâmetros para a extração são a utilização de uma solução aquosa com 15% de etanol, razão soluto:solvente de 1:30 e amplitude do dispositivo ultrassom em 80%. Com a utilização destes parâmetros, a resposta foi otimizada, estando dentro ou superior ao valor predito. Os parâmetros para o DPPH, cordicepina e adenosina não puderam ser otimizados por este modelo. É possível que a modelagem para otimização destes resultados esteja vinculada a outros solventes ou a utilização de outros métodos para a extração. Porém, como o objetivo da extração é a adição ao fermentado alcóolico de maçã para melhorar sua funcionalidade, é importante que os solventes sejam os mais próximos dos utilizados ou gerados na fermentação (água e etanol) e que também não onerem os produtores em relação ao custo, portanto a

adição de outros solventes como metanol, acetona e hexano, por exemplo, trariam mais etapas na produção e mais custos para que fosse feita sua completa retirada após a extração.

### **CAPÍTULO 3 - FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FERMENTADO ALCÓOLICO DE MAÇÃ ADICIONADO DE *C. MILITARIS***

#### **FORMULATION AND ANALYSIS OF THE *C. militaris*-ADDED APPLE CIDER**

##### **RESUMO**

Tendo em vista a necessidade de inovação, a busca por opções saudáveis e a valorização da produção nacional de maçãs, propõe-se a utilização de *C. militaris* para melhorar a qualidade funcional da sidra. Foram realizadas fermentações de 15 dias em frascos de 250 mL (200 mL útil), fechados com rolha e *airlock* a  $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ . As amostras foram separadas em grupo controle (C), cogumelo seco cominuído (COG), extrato otimizado (OTM) e meio líquido fermentado do fungo (ML). Análises (dias 1, 2, 3, 7, 10, 11, 15) incluíram contagem celular, viabilidade, pH e cor. O frasco 15 foi pesado diariamente para monitorar a cinética de fermentação. Ensaios demonstraram compatibilidade entre *C. militaris* e *Saccharomyces cerevisiae*, comprovada por microscopia eletrônica (colonização de leveduras) e parâmetros fermentativos eficientes. A adição de cogumelo (COG) aumentou a produção de  $\text{CO}_2$ , fenóis totais, ácido clorogênico e ácidos orgânicos, mas reduziu aromas e apresentou leve toxicidade em *Artemia salina* ( $\text{DL}_{50}$ :  $590 \pm 315$ ). O extrato (EXT) resultou em menor  $\text{CO}_2$ , maior etanol e redução de fenóis/aromas, sendo atóxico. Adições do cogumelo após o 12º dia prolongaram a fermentação. COGAFT (fermentação adicionada de cogumelo após o 12º dia) elevou fenóis, ácidos orgânicos (ácido málico), açúcar residual (~1%) e etanol, mantendo-se atóxico. EXTAF (fermentação adicionada de extrato após o 12º dia) aumentou fenóis versus controle e EXT. Ambas as fermentações AFT (adicionadas após o 12º dia) foram atóxicas. Este estudo é pioneiro na integração de *C. militaris* em fermentados de maçã, utilizando solventes verdes e revelando o cogumelo como suporte físico para leveduras. Elevados teores de ácido málico podem desafiar o equilíbrio sensorial; açúcar residual em suplementações tardias pode mitigar acidez. Estudos futuros devem otimizar a dosagem de cogumelo na bebida (valores menores que 6,6 g em 200 mL), analisar voláteis e realizar avaliações sensoriais.

Palavras-chave: toxicidade; compostos fenólicos; ácidos orgânicos; cogumelo.

## ABSTRACT

Given the need for market innovation, consumer demand for healthier options, and the goal of valuing Brazilian apple production, this research proposes using *C. militaris* to enhance the functional and sensory quality of national cider. Fermentations were conducted for 15 days in 250 mL flasks (200 mL working volume), sealed with stoppers and airlocks at  $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Test groups included: control (C), comminuted dried mushroom (COG), optimized extract (OTM), and fungal fermented liquid medium (ML). Analyses (days 1, 2, 3, 7, 10, 11, 15) included cell counting, viability, pH, and color. Flask 15 was weighed daily to monitor  $\text{CO}_2$  loss. Samples were stored ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) for future analyses. This study optimized phenolic extraction from *C. militaris* and validated the predictive model. Fermentation assays demonstrated compatibility between *C. militaris* and *Saccharomyces cerevisiae*, confirmed by electron microscopy (yeast colonization on mushroom microstructures) and efficient fermentative parameters (cell growth,  $\text{CO}_2$  production). Mushroom addition (COG) increased  $\text{CO}_2$  production rate, total phenols (chlorogenic acid), and organic acids versus control, but reduced aromas and showed slight toxicity to *Artemia salina*. Extract addition (EXT) resulted in lower  $\text{CO}_2$ , higher ethanol, and reduced phenols/aromas, but was non-toxic. Post-day-12 additions prolonged fermentation. COGAFT increased total phenols, organic acids (notably malic acid), residual sugar ( $\sim 1\%$ ), and ethanol while remaining non-toxic. EXTAFT increased phenols versus control and EXT, with similar acidity/residual sugar trends. Both AFT fermentations were non-toxic. This pioneering study integrates *C. militaris* into apple fermentations, uses green solvents for extraction, and reveals the comminuted mushroom as a yeast growth support. Elevated malic acid levels may challenge sensory balance; residual sugar in late supplementation may mitigate excessive acidity. Future studies should optimize dosage ( $<6.6$  g dry weight), qualitatively/quantitatively analyze volatile profiles, and conduct sensory evaluations.

Keywords: toxicity; phenolic compounds; organic acids; mushroom.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Produtores de maçã nos principais mercados de sidra (como Estados Unidos, França e Inglaterra) têm direcionado parte de sua produção para o cultivo de variedades próprias para sidra, impulsionando produção e a comercialização em mercados locais tanto artesanais quanto industriais.

Esta tendência vem muito acompanhada da busca do consumidor por produtos artesanais, os quais julgam ser mais confiáveis, saudáveis, inovadores e dentro do *farm to table* (da fazenda à mesa), ou seja, produtos que vem direto da fazenda. A proposta *farm to fork* (da fazenda ao garfo) foi inicialmente lançada em 2020 como parte do 'Acordo Verde Europeu' (*European Green Deal*) e inclui 27 objetivos para uma produção agrícola mais sustentável (Ostrom *et al.*, 2022).

Embora represente volume inferior ao de bebidas como cerveja e vinho, o mercado internacional de sidra mantém relevância significativa. Entre 2010 e 2019, registrou crescimento médio de pouco mais de 5% ao ano. Esse avanço reflete, sobretudo, a expansão acelerada no Leste Europeu, região sem tradição anterior, onde o mercado cresceu 400% entre 2010 e 2020, com destaque para Polônia, Ucrânia e Rússia (Ricome; Solano-hermosilla; Ciaian, 2022).

Outro motivo do aumento foi a recente descoberta (ou redescoberta) da bebida pelos jovens. O relatório da Comissão Europeia de 2022 apontou que as propagandas têm sido direcionadas a este público principalmente sob as alegações de bebida leve, sem glúten e a qual o mercado tem adicionado uma variedade de sabores (Ricome; Solano-hermosilla; Ciaian, 2022).

No Brasil, conforme relatado nos capítulos anteriores, a sidra é fabricada com maçãs de mesa, como a Gala e a Fuji, e são produtos de baixa qualidade e complexidade, consumidos em sua maioria durante as festas de fim de ano. Existe uma oportunidade de mercado a ser explorada no Brasil, que pode beneficiar suas maçãs para a produção de sidras e fermentados de maçã de maior complexidade de sabores e aromas, como ocorre com o setor vinícola, valorizando assim a matéria-prima e tendo retorno financeiro maior do que com a fruta *in natura*.

Neste capítulo serão exploradas possibilidades de melhorar a qualidade funcional da bebida fermentada alcóolica ainda utilizando a maçã de mesa (Gala), porém realizando adição de cogumelo como forma de adicionar compostos fenólicos, antioxidantes e aromas que aumentem a complexidade e tragam uma inovação que possa ser atrativa aos consumidores.

## 3.2 Materiais e Métodos

### 3.2.1 Fermentado Alcoólico de Maçã

Maçãs Galas (54 kg) foram selecionadas, lavadas e sanitizadas em uma imersão de hipoclorito de sódio (150 mg/L) por 15 min à 5 °C. Após o enxague em

água potável, foram submetidas à prensagem (Triturador/Prensa à Frio, AGM Máquinas, Bento Gonçalves, RS, BR) até a extração máxima do líquido. O rendimento do mosto de maçã foi calculado ( $\eta$ : 72%) e então despectinizado (Enzima Pectinex 3XL, Novozymes, Curitiba, Brasil) em concentração de 3 mL/hL (40°C por 30 min). A trasfega foi realizada, e o mosto de maçã despectinizado foi utilizado nos experimentos de fermentação alcoólica.

O mosto extraído continha 11,75 g/100 mL de sólidos solúveis e foi submetido a fermentação em frasco de 250 mL de capacidade e 200 mL de volume útil. Neste frasco é adicionado uma rolha e *airlock*. A fermentação controle foi realizada utilizando mosto de maçã Gala e levedura *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 20 g/hL (Reims Champagne, Fermol, California, EUA).

#### 3.2.1.1 Testes preliminares de fermentação com extrato de *C. militaris*

Os experimentos foram realizados com objetivo de verificar inicialmente a compatibilidade da fermentação alcoólica adicionada de extrato de *C. militaris*. Esta fermentação ocorreu por 15 dias, a  $20 \pm 2$  °C. Instituíram-se três grupos de fermentação: controle P (sem adição de cogumelo), fermentação 1 – C1 (com adição de 10% de extrato com concentração de 20 g/L) e fermentação 2 – C2 (com adição de 10% de extrato 200 g/L). A quantidade de extrato a ser adicionada ao mosto foi determinada de acordo com Jiang *et al.* (2020).

A fermentação foi realizada em frascos erlenmeyers de capacidade 250 mL, com 200 mL de líquido (mosto, ou mosto + extrato). A levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* foi adicionada depois de hidratada, na concentração de 20 g/hL. O frasco foi tampado com rolha de silicone perfurada por agulha, conectada em uma mangueira de silicone que tinha sua saída em um frasco com metabissulfito de potássio (200 mg/L).

#### 3.2.1.2 Fermentação do mosto de maçã com diferentes adições de cogumelo

Após os testes iniciais, foram instituídos os grupos para fermentação. O Quadro 3 tem a representação das siglas e das fermentações realizadas. As

fermentações duram 15 dias, em  $20 \pm 2$  °C, em frascos de 250 mL com 200 mL de líquido total, seja este adicionado ou não de cogumelos.

Quadro 3. Relação de siglas e significados de cada grupo de fermentação.

| Sigla  | Significado                                                                                                                                                                |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C      | Fermentação controle, sem adição de cogumelos                                                                                                                              |
| EXT    | Fermentação adicionada do extrato otimizado (33 g/L do cogumelo solução hidroalcolica 15%) no tempo 0                                                                      |
| COG    | Fermentação adicionada do cogumelo em pó, cominuído, acondicionado em saco de chá de TNT e mergulhado no mosto no dia 0 e mantido até o dia 15 da fermentação              |
| ML     | Fermentação adicionada do meio líquido fermentado do <i>C. militaris</i> no dia 0 da fermentação                                                                           |
| COGAFT | Fermentação adicionada do cogumelo em pó, cominuído, acondicionado em saco de chá de TNT e mergulhado no fermentado de maçã no 12° dia de fermentação e mantido por 5 dias |
| EXTAFT | Fermentação adicionada do extrato otimizado (33 g/L) no 12° dia de fermentação e mantido por 5 dias                                                                        |

Fonte: autoria própria

Todos os parâmetros fermentativos são os mesmos da fermentação inicial descrita na sessão anterior, com exceção da utilização de *airlock* do tipo S no lugar dos batoques (Figura 7). O *airlock* foi enchido com água destilada e levemente tampado para evitar evaporação.

A adição do cogumelo cominuído foi realizada em 6,6 g tendo em vista a concentração do extrato otimizado (33 g/L), ou seja, para alcançar esta concentração foram utilizados 33 g em 1 L, em 200 mL, sendo 6,6 g. A quantidade de extrato e de meio líquido fermentado seguiu o estudo de Jiang *et al.* (2020), já utilizado na fermentação anterior.

As fermentações AFT (COGAFT e EXTAFT) são realizadas de forma diferente. Para observar se o tempo em que a adição dos cogumelos e do extrato é feita na fermentação alterará a produção de compostos fenólicos, antioxidantes e voláteis, esta fermentação foi realizada por 12 dias (período até a fermentação terminar a fase estacionária) sem nenhuma adição, e após este período, foi adicionado um saco de chá de TNT contendo pérolas de vidro para garantir a submersão do material e 6,6 g do cogumelo cominuído e seco na COGAFT e 20 mL do extrato otimizado na fermentação EXTAFT.

Na seção resultados, observa-se que a fermentação ML não foi bem-sucedida e que o meio líquido tem um conteúdo não compatível com o crescimento das leveduras. Por este motivo, para não deixar o texto confuso, a fermentação ML está citada nesta seção, mas a metodologia detalhada e os resultados obtidos serão separados no item 3.4, onde constará um melhor detalhamento desta fermentação.

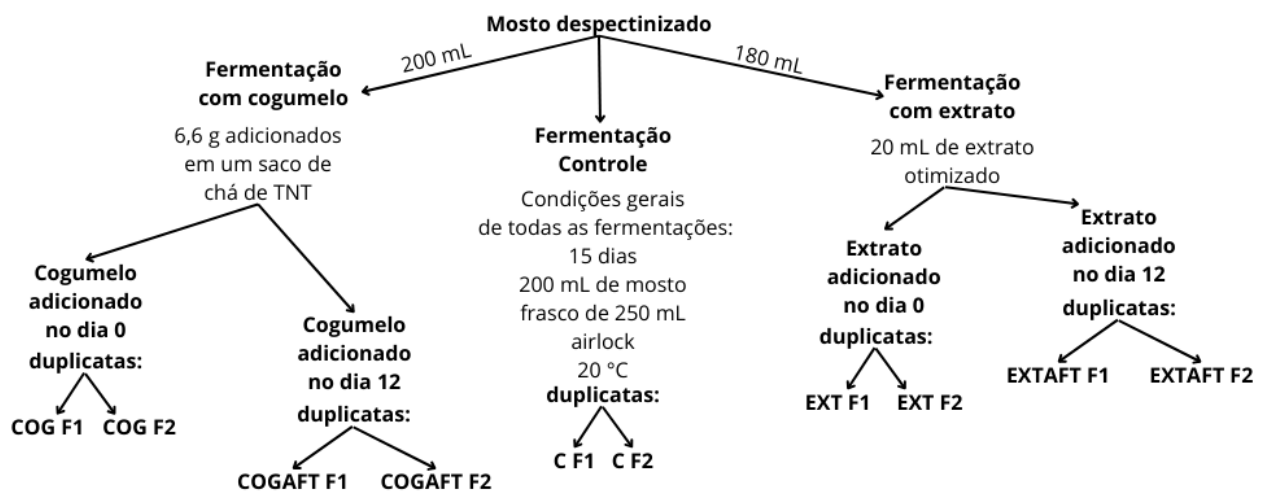
Figura 7. Fermentações com *airlock* tipo S.



Fonte: autoria própria

Na Figura 8, foi realizado o desenvolvimento de um fluxograma para melhor compreensão da metodologia utilizada para as fermentações e da definição dos códigos de cada amostra.

Figura 8. Fluxograma das fermentações e códigos utilizados para as amostras



Fonte: autoria própria

### 3.2.2 Cinética e Análise dos Fermentados

Os fermentados foram pesados diariamente para monitorar a perda de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) (Bely *et al.*, 1990; Roger *et al.*, 2002). Foi preparado um frasco para cada dia de amostra, 1, 2, 3, 7, 10, 11 e 15, assim, cada um dos frascos quando atinge o seu dia, teve a sua fermentação interrompida, coletou-se uma alíquota após homogeneização para contagem em câmara de Neubauer (XB-K-25, SMIC, China) onde também foi feita coloração com azul de metileno a 0,01% para determinar a viabilidade celular (ZEISS, AXIO-HAL100, Jena, Alemanha) (Pierce, 1970). O restante do fermentado alcoólico foi centrifugado por 15 minutos a 2224 g (Centrifuga, MPW-351, Med. Instruments®, Varsóvia, Polônia). O sobrenadante foi levado para medição do pH (Marte científica, One Sense pH2500, São Paulo, Brasil) e cor utilizando um colorímetro digital (Konika Minolta, CM-5, Tóquio, Japão). O restante foi congelado a -20 °C para análises futuras. Um controle inicial foi realizado no tempo zero. Todas as fermentações ocorreram em duplicata.

#### 3.2.2.1 *Fenólicos totais, antioxidantes, cordicepina e adenosina*

As análises de compostos fenólicos totais, antioxidantes (DPPH, FRAP e ABTS) e a quantificação de cordicepina e adenosina foram determinadas de acordo com os métodos descritos no capítulo II e utilizando os mesmos reagentes supracitados.

#### 3.2.2.2 *Análise de açúcares por HPLC*

Foi utilizado o método de Santos *et al.* (2018) para as determinações de açúcares. As amostras foram diluídas, com água ultrapura (Milli-Q Integral®, Millipore®, São Paulo SP, Brazil), filtradas em filtro seringa de *nylon* de 0,22 µm (Waters, Milford, MA, EUA) e transferidas para *vials*. A análise foi feita em um sistema Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters 2695 Alliance, Milford, MA, EUA) com um detector de índice de refração (RI 2414, Milford, MA, EUA) uma bomba quaternária (Waters 2695 Alliance, Milford MA, EUA), desgaseificador e auto injetor. Utilizando-se uma coluna Bio-Rad HPX 87H (300 × 7.8 mm) em condição isocrática de uma solução aquosa de 0,006 M de ácido sulfúrico com volume de injeção de 10

$\mu\text{L}$  e taxa de fluxo de 0,5 mL/min com a coluna aquecida e mantida a 30 °C e o detector também nesta temperatura. As áreas dos picos foram obtidas e comparadas com as curvas padrão da sacarose ( $y = 10^7x - 147314$ ,  $R^2 = 0,998$ ), da D-glicose ( $y = 10^7 - 58762$ ,  $R^2 = 0,9976$ ), da D-frutose ( $y = 10^7x - 23717$ ,  $R^2 = 0,9971$ ) e do etanol ( $y = 3.10^6x - 54534$ ,  $R^2 = 0,9969$ ). Os resultados foram expressos em porcentagem.

### 3.2.2.3 *Teor alcóolico*

O teor alcoólico foi determinado por meio de ebulliômetro (010154, Techvision, Brasil).

### 3.2.2.4 *Análise de ácidos orgânicos por HPLC*

As amostras foram analisadas quanto à concentração de ácidos orgânicos (galacturônico, glucurônico, málico, láctico, acético, isobutírico e butírico), segundo método de Santos *et al.* (2014). Para a separação desses compostos utilizou-se uma coluna Aminex HPX-87H (300  $\times$  7,8 mm) a 30 °C. A fase móvel constituída de ácido sulfúrico (0,005 mol/L) em modo isocrático, com fluxo de 0,5 mL/min e volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$  de amostra. A quantificação foi calculada pelas curvas de calibração do ácido galacturônico ( $y = 4.10^6x + 29815$ ;  $R^2 = 0,9952$ ), glucurônico ( $y = 6.10^6x + 97565$ ;  $R^2 = 0,9956$ ), ácido málico ( $y = 9.10^6x + 16081$ ;  $R^2 = 0,9953$ ), ácido láctico ( $y = 10^7x - 34388$ ;  $R^2 = 0,9956$ ) e ácido acético ( $y = 9.10^6x - 75766$ ;  $R^2 = 0,9949$ ), ácido isobutírico ( $y = 9.10^6x - 92505$ ;  $R^2 = 0,9956$ ) e ácido butírico ( $y = 6.10^6x - 124032$ ;  $R^2 = 0,9955$ ).

### 3.2.2.5 *Toxicidade das sidras em Artemia salina*

A análise de toxicidade em nauplios de *A. salina* foi realizada conforme descrita no capítulo II. Com a diferença que ao invés de extrato, foram analisadas as sidras nas mesmas diluições descritas.

### 3.2.2.6 *Perfil fenólico*

Para a análise de perfil fenólico primeiro uma alíquota de 25 mL de cada amostras foi liofilizada (LD 1500, Terroni®, São Paulo, Brasil) até a completa retirada

de água das amostras. Após esse processo elas foram ressuspensas em 3 mL de uma solução 3:1 de ácido acético 2,5% e metanol 99% (Alberti *et al.*, 2014).

As amostras foram filtradas em filtro seringa de *nylon* de porosidade 0,22 µm (Waters, Milford, MA, EUA) e transferidas em *vials*. As amostras foram analisadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo-se o método de Alberti *et al.* (2014). O sistema CLAE (Waters 2695 Alliance, Milford, MA, EUA) é equipado com detector de matriz de fotodiodos PDA 2998 (Waters, Milford, MA, EUA), bomba quaternária e amostrador automático, coluna Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm, Waters, Milford, MA, EUA). A fase móvel é constituída de solução de ácido acético 2,5 % (A) e acetonitrila (B). O gradiente inicia em 3-9 % B (0-5 min), 9-16 % (5-15 min), 16-36,4% B (15-33 min), 36,4-100 % B (33-48 min) e recondicionamento da coluna 3 % B (10 min) nas condições de: fluxo 1,0 mL/min; coluna a 20°C. As detecções foram feitas a 280 nm para flavan- 3-ols e dihidrochalconas; a 320 nm para ácidos hidroxicinâmicos; e 350 nm para flavonóis. Compara-se o tempo de retenção e espectro dos picos com os de padrões para identificação e quantificação. Os padrões utilizados foram: ácido gálico ( $y = 29405x - 316118$ ,  $R^2 = 0,9989$ ), catequina ( $y = 4426,9x + 80508$ ,  $R^2 = 0,9384$ ), epicatequina ( $y = 6127,6x - 17085$ ,  $R^2 = 0,9961$ ), floridizina ( $y = 26549x - 662698$ ,  $R^2 = 0,9875$ ), elágico ( $y = 26737x - 689515$ ,  $R^2 = 0,9902$ ), ácido clorogênico ( $y = 29624x - 337246$ ,  $R^2 = 0,9976$ ), ácido cafeico ( $y = 56620x - 10^6$ ,  $R^2 = 0,9902$ ) e trans-ferrulico ( $y = 55433x - 781991$ ,  $R^2 = 0,9971$ ). Os resultados foram expressos em mg/L.

### 3.2.2.7 Análise de compostos voláteis

A otimização do método para análise de compostos voláteis foi realizada no laboratório de métodos instrumentais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Ponta Grossa. Tomou-se como princípio o método pesquisado por Pietrowski *et al.* (2012).

Inicialmente foi preparada uma solução estoque com 50 µL de cada padrão volátil (9 padrões = 450 µL) e completa um balão volumétrico de 100 mL com uma solução etanol (5%) e água (95%). A curva foi preparada diluindo a solução estoque em concentrações de 0,00078% até 0,0250%.

A captura dos compostos voláteis foi realizada pelo sistema de *headspace*. Em um *vial* com tampa do tipo *crimp* com capacidade de 20 mL, foram colocados 5

mL de amostra. O *vial* foi lacrado para evitar a saída de voláteis e no sistema de *headspace* a amostra foi aquecida e agitada por 20 min a 90 °C, com o shaker ligado por 10 minutos. A amostra é então aliquoteada no *autosampler* em quantidade de 2000 µL e injetada no cromatógrafo (Young Lin, YL 6100 GC, Coreia). A coluna utilizada para esta análise foi a ZB-WAX (Phenomenex, 30 m x 25 mm x 0,25 µm). O detector utilizado foi um FID (detector de ionização de chama). A temperatura do injetor foi de 220 °C e a temperatura do detector, 230 °C. O gás de arraste foi nitrogênio, com fluxo de 2 mL/min, e a técnica de injeção foi split 1:10. A corrida se inicia com 35 °C por 5 min e então há uma rampa de 3 °C/min até os 50 °C. Dos 50 aos 60 °C a temperatura sobe a 20 °C/min. Dos 60 °C até os 100 °C foi feita uma rampa de 3 °C/min e então dos 100 aos 240 °C a temperatura sobe a uma taxa de 25 °C/min. Esta temperatura foi mantida por 5 minutos para limpeza e então retorna para 35 °C para acondicionamento até preparação da nova amostra. A curva de quantificação foi construída com os padrões: butirato de etila ( $y = 805601x + 363,75$ ,  $R^2 = 0,9967$ ), 2-hexanona ( $y = 454810x + 331,02$ ,  $R^2 = 0,992$ ), 1-octen-3-ol ( $y = 193156x + 341,53$ ,  $R^2 = 0,9512$ ), 2-heptanona ( $y = 532958x + 413,84$ ,  $R^2 = 0,9867$ ), hexil acetato ( $y = 767262x + 489,87$ ,  $R^2 = 0,9872$ ), isopentil acetato ( $y = 808616x + 294,85$ ,  $R^2 = 0,9951$ ), 1-pentanol ( $y = 81543x + 130,86$ ,  $R^2 = 0,9577$ ), propil acetato ( $y = 537756x + 1191,4$ ,  $R^2 = 0,99$ ) e 3-metil-1-butanol ( $y = 106724x + 161,95$ ,  $R^2 = 0,9518$ ).

### 3.2.2.8 *Imagens em microscopia eletrônica de varredura*

As imagens de microscopia eletrônica foram obtidas no complexo de laboratórios multiusuário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As amostras foram retiradas do saco de TNT, dispostas em uma placa de petri e levadas para liofilização (LD 1500, Terroni®, São Paulo, Brasil). As amostras passaram então por recobrimento de ouro e então as imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo com alta performance com sistemas EBSD e EDS acoplados (Mira 3, Tescan, São Bernardo do Campo, SP)

### 3.2.2.9 *Análise de cor*

As análises de cor foram realizadas em colorímetro digital (marca Konica Minolta, Modelo CM-5, Japão) e processadas de acordo com o espaço CIE-Lab (Commission Internationale de l'Eclairage) a partir das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

### 3.2.2.10 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. As diferenças entre as amostras foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA, fator único), seguido de teste de médias de Fischer LSD. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software Statistica 8* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Para o ensaio com *Artemia salina* foi utilizado o software Minitab e a análise por Probito.

## 3.3 RESULTADOS

### 3.3.1 Resultados dos Testes Preliminares de Fermentação

Os resultados obtidos na investigação inicial realizada com os extratos de 450 mm, extraídos em solução hidroalcóolica 7% e em concentrações de 20 g/L e 200 g/L estão contidos na Figura 9. A fermentação controle (P) produziu ao final dos 15 dias 5,92 °GL de álcool, a fermentação C1 7,35 °GL e a fermentação C2 6,85 °GL.

Pela Figura 9 é possível observar que a fermentação C1, que foi adicionada de extrato 20 g/L, iniciou a fermentação de forma bem parecida com a fermentação controle, porém entre o 6° e o 8° dia, a produção de CO<sub>2</sub> continuou a aumentar, enquanto a fermentação controle iniciou o processo de estabilidade.

A fermentação C2, adicionada de extrato com concentração 200 g/L, teve uma fermentação com menor produção de CO<sub>2</sub> e sua fase exponencial foi mais prolongada. Possivelmente por influência da alta concentração do extrato.

Em relação às velocidades, a fermentação controle teve uma velocidade máxima de 5,15 g/L/d durante a fase exponencial, a fermentação C1 teve 7,19 g/L/d e C2 5,03 g/L/d. O extrato em baixa concentração (C1) pode ter favorecido o metabolismo celular da *S. cerevisiae*, o que aumentou a produção de CO<sub>2</sub> e de etanol.

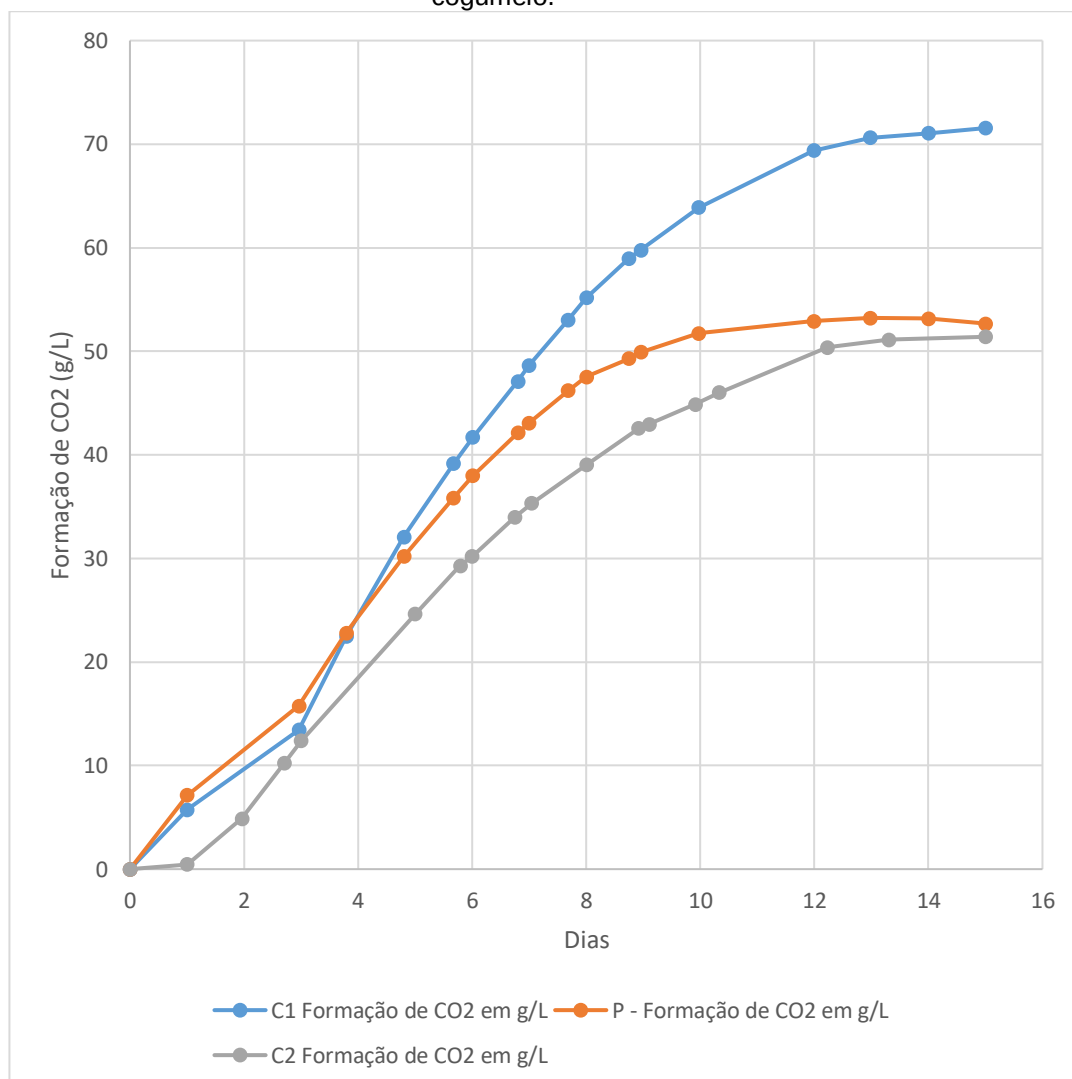
O fungo apresenta um elevado teor de nitrogênio, que pode ter contribuído para os efeitos observados nas fermentações adicionadas de extrato 20 e 200 g/L. Além dos aminoácidos, o material fúngico adicionado pode conter ergosterol (não avaliado neste estudo), que na fermentação anaeróbica pode atuar no lugar do oxigênio no metabolismo das leveduras. O ergosterol atua aumentando o crescimento,

o metabolismo, a viabilidade das leveduras e melhorando a resistência aos altos teores de açúcar e ao estresse por etanol (Girardi-Piva *et al*, 2022). Portanto, é provável que o nitrogênio e o oxigênio não tenham sido limitantes nas fermentações alcoólicas. No estudo de Chauhan e Sharma (2024), foram quantificados 61,73 mg/100g de ergosterol no corpo frutificado do *C. militaris*, ou seja, no cogumelo.

Ainda assim, ambas fermentações foram bem-sucedidas, em relação a cinética, não demonstrando inibição às leveduras. A fermentação teste aconteceu antes da otimização do extrato, descrita no capítulo II. Este teste guiou a escolha dos valores de razão soluto:solvente, tendo como conclusão aqui que concentrações entre 20 e 200 g/L não inibiram a levedura.

O extrato otimizado foi analisado quanto ao teor de cordicepina e adenosina e teve como resultado:  $0,70 \pm 0,01$  e  $0,45 \pm 0,01$  mg/L respectivamente. Entretanto, a cordicepina e a adenosina não foram detectados nos experimentos com sidra. Como esses compostos estão presentes em baixas quantidades no extrato, é possível que a quantidade adicionada (20 mL) não seja suficiente para que os compostos sejam detectáveis na sidra.

Figura 9. Liberação de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) em fermentações controle e adicionada de extrato de cogumelo.



Nota: C1: fermentação adicionada de 20 mL de extrato 20 g/L. P: fermentação controle. C2: fermentação adicionada de 20 mL de extrato 200 g/L

### 3.3.2 Resultados da Cinética e Análises das Fermentações com Duração de 15 dias

Foram realizadas as fermentações controle (C); a adicionada de cogumelo seco cominuído em saco de chá (COG); a adicionada de extrato otimizado (EXT); e a adicionada de meio líquido fermentado do *C. militaris* (ML). Conforme relatado na metodologia, 7 frascos do tipo erlenmeyer foram montados para cada um dos grupos, de forma a poder parar a fermentação em cada dia escolhido para monitoramento da fermentação (dias 1, 2, 3, 7, 10, 11 e 15), conforme observado na **Error! Reference source not found..**

Figura 10. Experimento com diferentes tratamentos no início da fermentação alcoólica.



Fonte: a autora.

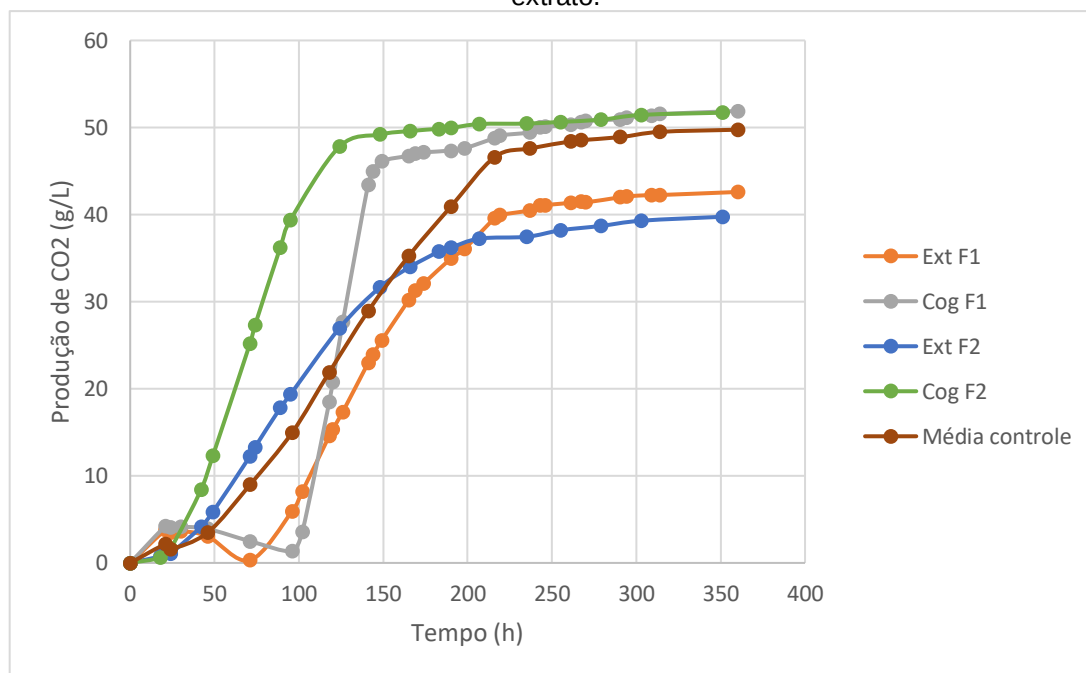
Na Figura 11 está representada a cinética de liberação de  $\text{CO}_2$  por hora de fermentação. A fermentação ML não está representada na figura pois não atingiu nem 10 g/L de produção de  $\text{CO}_2$  durante os 15 dias de fermentação, por este motivo, os dados desta fermentação estão separados no item 3.4. Na Figura 11 observa-se o crescimento celular nos dias 1, 2, 3, 7, 10, 11 e 15 dos 3 grupos e suas replicatas.

Em relação às velocidades máximas ( $\mu_{\text{max}}$ ), o controle teve velocidade de 6,09 g/L/d, a primeira fermentação adicionada de extrato (EXT F1) teve  $\mu_{\text{max}}$  de 6,43 e a segunda (EXT F2) de 5,23. A fermentação COG F1 teve  $\mu_{\text{max}}$  de 20,29 e COG F2 de 11,08 g/L/d. A fermentação controle teve comportamento muito similar ao controle dos testes de fermentação, na seção anterior, o que era esperado. A fermentação com o cogumelo teve velocidades máximas muito superiores à fermentação controle, possivelmente pelo maior aporte de nitrogênio inicial.

Uma diferença observada entre as fermentações 1 e 2 foi o tempo gasto na fase de adaptação (fase lag). As fermentações 1 demoraram ao menos 70 h para iniciar a fase exponencial, enquanto as fermentações 2 iniciaram a exponencial dentro de 24h. Devido a uma reforma nos laboratórios, a fermentação 1 ocorreu dentro do laboratório com temperatura controlada por ar-condicionado, tendo variado em média  $\pm 2^\circ\text{C}$ . A fermentação 2 foi desenvolvida em incubadora BOD (SPLabor, Presidente

Prudente, SP), isso fez com que a temperatura variasse menos, que refletiu no início da fermentação imediata, enquanto as fermentações 1 tiveram um tempo de adaptação aumentado.

Figura 11. Produção de CO<sub>2</sub> nas fermentações controle, adicionada de cogumelo e adicionada de extrato.



Nota: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; Média controle: média dos controles F1 e F2.

Na Tabela 8 é possível acompanhar a progressão do pH de cada fermentação durante os dias de amostragem. O extrato otimizado tem pH de 4,88. É possível notar que as fermentações com adição tiveram um leve aumento no pH comparado ao controle durante todos os pontos de amostragem.

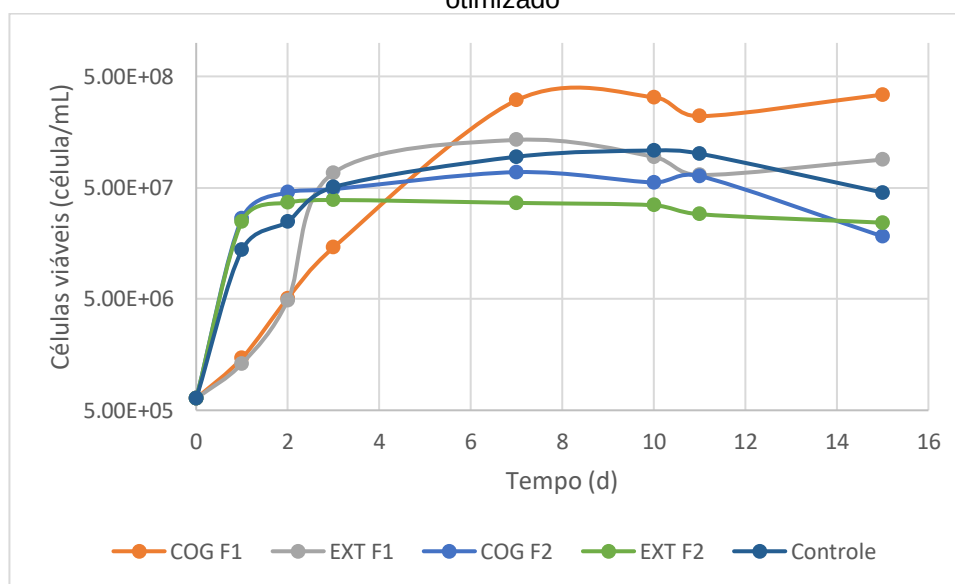
Tabela 8. Progressão do pH das fermentações durante os dias amostrais

| Tempo (h) | Controle    | COG         | EXT         |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| 0         | 4,05 ± 0,0  | 4,1 ± 0,0   | 4,1 ± 0,0   |
| 24        | 4,12 ± 0,09 | 4,08 ± 0,08 | 4,09 ± 0,0  |
| 48        | 4,35 ± 0,47 | 4,45 ± 0,45 | 4,46 ± 0,54 |
| 72        | 4,28 ± 0,53 | 4,51 ± 0,62 | 4,40 ± 0,63 |
| 170       | 4,22 ± 0,45 | 4,36 ± 0,30 | 4,33 ± 0,47 |
| 240       | 3,99 ± 0,29 | 4,38 ± 0,39 | 4,37 ± 0,59 |
| 264       | 3,87 ± 0,01 | 4,40 ± 0,47 | 4,2 ± 0,42  |
| 360       | 4,00 ± 0,00 | 4,44 ± 0,30 | 4,49 ± 0,52 |

Nota: resultados expressos em média ± desvio padrão

Na Figura 12, é demonstrada a cinética de crescimento celular, as curvas apresentadas correspondem a contagem de células viáveis nos dias de amostragem. Como a contagem de células viáveis desconta o valor de células mortas, algumas variações do gráfico se dão pelo aumento ou diminuição de células mortas durante a fermentação.

Figura 12. Cinética de crescimento celular das amostras controle, adicionada de cogumelo e extrato otimizado



Nota: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; Média controle: média dos controles F1 e F2.

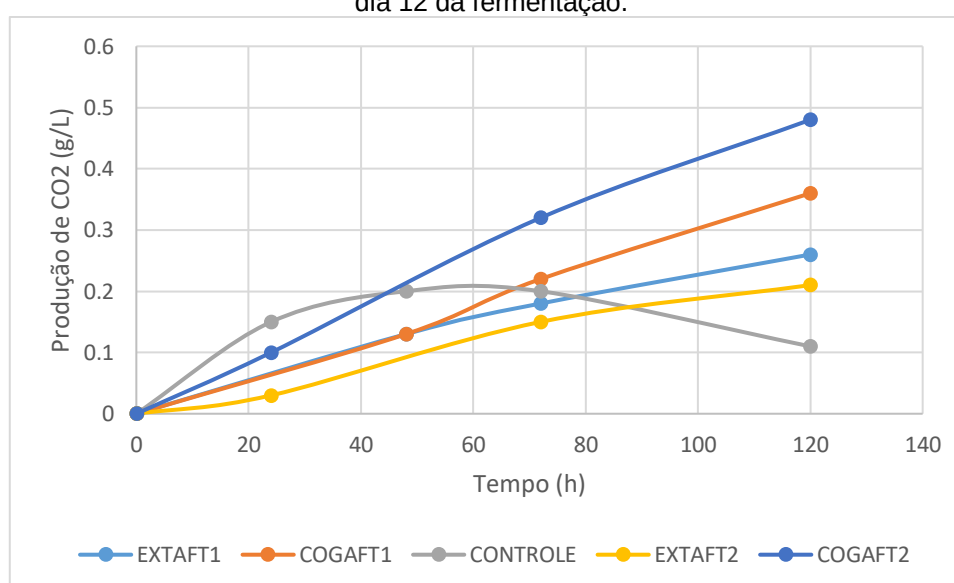
### 3.3.3 Resultados da Cinética e Análises das Fermentações Adicionadas de Cogumelo no 12º Dia

Na Figura 13 estão apresentados os resultados de produção de  $\text{CO}_2$ . O gráfico se inicia no momento da adição, que aconteceu no 12º dia, e foi representado como hora 0. Neste momento, a fermentação já está em fase estacionária, e a produção de 0,2 g/L de  $\text{CO}_2$  que se observa até pouco mais de 40h é normal para esta fase. Após 80h observa-se o início de uma fase de declínio na fermentação controle, o que não acontece nas fermentações adicionadas (COGAFT e EXTAFT) que demonstram uma tendência de crescimento da produção de  $\text{CO}_2$ . Ainda que, em uma visão geral, essa produção não seja suficiente para visualizar uma mudança da fase estacionária

durante este período, é possível observar uma mudança de tendência, vista também comparando as velocidades pré e pós adição do controle e dos tratamentos.

No controle percebe-se uma redução da velocidade mais brusca, chegando inclusive a um novo ganho de peso na fermentação. Nas fermentações adicionadas, tem-se uma redução da velocidade, comparado ao período pré-adição, porém com um prolongamento da fase estacionária e com o que se observa na Figura 13, um aumento progressivo da produção, o que indica uma tendência ao aumento.

Figura 13. Produção de CO<sub>2</sub> por hora nas fermentações controle, COGAFT e EXTAFT após adição no dia 12 da fermentação.



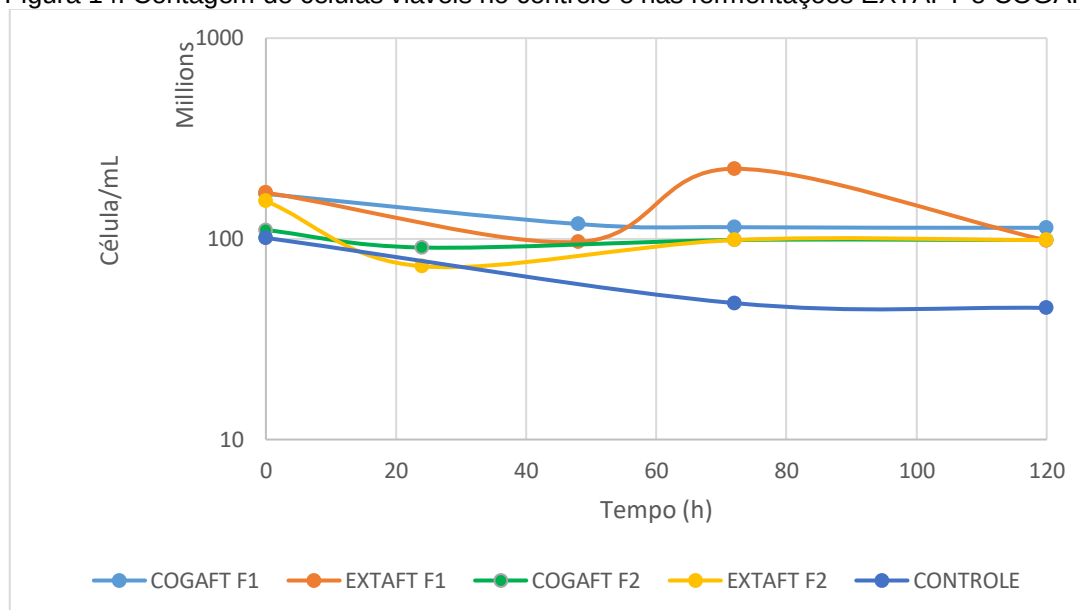
Nota: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; Controle: média dos controles F1 e F2.

Tabela 9. Velocidades instantâneas de formação de CO<sub>2</sub> pré e pós o momento da adição do cogumelo e do extrato.

|          | <b>Velocidade no intervalo dos dias 10 a 12 (g/L/d)</b> | <b>Velocidade no período pós adição (g/L/d)</b> |
|----------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Controle | 0,96                                                    | -0,0100                                         |
| COGAFT   | 0,24 ± 0,12                                             | 0,086 ± 0,012                                   |
| EXTAFT   | 0,288 ± 0,096                                           | 0,044 ± 0,0012                                  |

Na Figura 14, demonstram-se as tendências de crescimento celular após o período de adição do extrato e do cogumelo. Vê-se que o controle está em um claro declínio, enquanto os fermentadores com adição demonstram uma tendência de manutenção, demonstrando um prolongamento da fase estacionária, corroborado pelos dados de produção de CO<sub>2</sub> e pelas velocidades instantâneas.

Figura 14. Contagem de células viáveis no controle e nas fermentações EXTAFI e COGAFT



Nota: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; Média controle: média dos controles F1 e F2.

Nas próximas seções, os resultados para as fermentações de 15 dias e as fermentações AFT foram apresentados juntos para facilitar a compreensão e comparação dos dados. Inicialmente, foram apresentados os dados detalhados de cada análise e por último, foi formulada uma tabela comparativa dos pontos iniciais e finais das fermentações em todas as análises.

### 3.3.3.1 Resultados da análise de açúcares por HPLC

Nesta seção, serão discutidas as respostas obtidas a partir da análise por HPLC da composição de açúcares e etanol. O mosto, conforme relatado, foi analisado por refratômetro e teve determinado a quantidade de 11,75 °B. O ebuliômetro também foi utilizado para pré-determinar o teor alcoólico em °GL e guiar as diluições necessárias para realizar a determinação de % etanólica em HPLC, conforme relatado na metodologia.

Inicialmente, observa-se que o extrato otimizado apresenta um teor de 1,68%  $\pm$  0,01 de sacarose, 0,43%  $\pm$  0,01 de glicose, 0,67%  $\pm$  0,00 de frutose e 14%  $\pm$  0,31 de

etanol. A extração foi realizada com 15% de etanol, conforme otimizado no capítulo anterior, porém, se considerarmos que o processo de extração dura 15 minutos e que o dispositivo ultrassom, por meio do probe, acaba gerando calor na amostra (controlado por meio de resfriamento externo), pode ter causado uma evaporação demonstrada no resultado por HPLC.

Em todas as fermentações o comportamento é de maior concentração de açúcares no início da fermentação que vai sendo utilizado pelas leveduras e transformado em etanol e gás carbônico, o que se observa pela quantificação de etanol na Tabela 10, onde não há presença nos primeiros dias e tem maiores teores ao final da fermentação.

Nas fermentações controle não há sacarose ou glicose residual, apenas frutose ( $0,40\% \pm 0,07$  em F1 e  $0,61\% \pm 0,01$  em F2). Isto se repete nas outras fermentações, com exceção de COG F1 (que teve um residual de  $0,13\% \pm 0,01$  de sacarose), COGAFT F1 (com residual de  $0,3\%$  de sacarose e  $0,87\%$  de frutose), COGAFT F2 (com residual de  $0,52\%$  de sacarose,  $0,08\%$  de glicose e  $0,75\%$  de frutose) e EXTAF1 F1 ( $0,21\% \pm 0,01$  de sacarose e  $0,80\% \pm 0,01$  de frutose) e EXTAF1 F2 ( $0,12\% \pm 0,01$  de sacarose e  $0,62\% \pm 0,01$  de frutose).

A inserção do cogumelo e do extrato no 12º dia adiciona poucos açúcares à fermentação. Isso também é visto na fermentação COG (adicionada de cogumelo). O fato de o mosto ter um alto teor de açúcares e sólidos solúveis diminui a saída de açúcares do cogumelo para o meio fermentativo, tendo em vista os princípios da osmose. No caso do extrato, estes compostos já foram retirados da matriz em uma solução de menor osmolaridade (solvente etanol e água 15%), portanto ao adicioná-lo ao mosto, vê-se um aumento considerável de açúcares (com exceção da frutose) e do etanol.

Tabela 10. Teores de sacarose, glicose, frutose e etanol nos dias iniciais e finais da fermentação.  
(continua)

| Amostra        | Tempo (dias) | Sacarose (%)      | Glicose (%)       | Frutose (%)            | Etanol (%)           |
|----------------|--------------|-------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| EXT OTM        | -            | $1,68^c \pm 0,01$ | $0,43^i \pm 0,01$ | $0,67^{ghij} \pm 0,00$ | $14,00^a \pm 0,31$   |
| Controle<br>F1 | 0            | $2,58^b \pm 0,17$ | $3,48^c \pm 0,00$ | $11,83^a \pm 0,04$     | <LQ                  |
|                | 1            | $0,97^g \pm 0,02$ | $2,14^h \pm 0,06$ | $7,47^e \pm 0,13$      | <LQ                  |
|                | 15           | <LQ               | <LQ               | $0,40^{kl} \pm 0,07$   | $6,49^{hi} \pm 0,18$ |

Tabela 10. Teores de sacarose, glicose, frutose e etanol nos dias iniciais e finais da fermentação. (conclusão)

| Amostra     | Tempo (dias) | Sacarose (%)               | Glicose (%)              | Frutose (%)                 | Etanol (%)                |
|-------------|--------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Controle F2 | 0            | 2,58 <sup>b</sup> ± 0,17   | 3,48 <sup>c</sup> ± 0,00 | 11,83 <sup>a</sup> ± 0,04   | <LQ                       |
|             | 1            | <LQ                        | 2,89 <sup>e</sup> ± 0,00 | 8,95 <sup>c</sup> ± 0,01    | <LQ                       |
|             | 15           | <LQ                        | <LQ                      | 0,61 <sup>ijk</sup> ± 0,01  | 6,46 <sup>i</sup> ± 0,06  |
| COG F1      | 0            | 2,51 <sup>b</sup> ± 0,01   | 3,61 <sup>b</sup> ± 0,02 | 11,63 <sup>a</sup> ± 0,02   | <LQ                       |
|             | 1            | 1,42 <sup>d</sup> ± 0,003  | 2,70 <sup>f</sup> ± 0,01 | 8,90 <sup>c</sup> ± 0,03    | 0,64 <sup>m</sup> ± 0,02  |
|             | 15           | 0,13 <sup>m</sup> ± 0,01   | <LQ                      | 0,55 <sup>kl</sup> ± 0,01   | 6,61 <sup>h</sup> ± 0,05  |
| COG F2      | 0            | 2,51 <sup>b</sup> ± 0,01   | 3,61 <sup>b</sup> ± 0,02 | 11,63 <sup>a</sup> ± 0,02   | <LQ                       |
|             | 1            | 1,119 <sup>f</sup> ± 0,004 | 3,11 <sup>d</sup> ± 0,00 | 9,34 <sup>b</sup> ± 0,01    | 0,73 <sup>m</sup> ± 0,00  |
|             | 15           | <LQ                        | <LQ                      | 0,75 <sup>ghij</sup> ± 0,00 | 6,95 <sup>f</sup> ± 0,04  |
| EXT F1      | 0            | 4,58 <sup>a</sup> ± 0,03   | 4,15 <sup>a</sup> ± 0,00 | 11,42 <sup>a</sup> ± 0,00   | <LQ                       |
|             | 1            | 1,21 <sup>e</sup> ± 0,02   | 2,34 <sup>g</sup> ± 0,00 | 7,45 <sup>e</sup> ± 0,01    | 2,41 <sup>k</sup> ± 0,01  |
|             | 15           | <LQ                        | <LQ                      | 0,37 <sup>l</sup> ± 0,01    | 8,38 <sup>b</sup> ± 0,01  |
| EXT F2      | 0            | 4,58 <sup>a</sup> ± 0,03   | 4,15 <sup>a</sup> ± 0,00 | 11,42 <sup>a</sup> ± 0,00   | <LQ                       |
|             | 1            | 0,48 <sup>i</sup> ± 0,00   | 2,69 <sup>f</sup> ± 0,01 | 8,43 <sup>d</sup> ± 0,03    | 2,11 <sup>l</sup> ± 0,03  |
|             | 15           | <LQ                        | <LQ                      | 0,63 <sup>hij</sup> ± 0,01  | 6,93 <sup>fg</sup> ± 0,01 |
| COGAFT F1   | 0            | 0,31 <sup>j</sup> ± 0,02   | <LQ                      | 0,91 <sup>f</sup> ± 0,08    | 6,06 <sup>j</sup> ± 0,01  |
|             | 5            | 0,30 <sup>i</sup> ± 0,00   | <LQ                      | 0,87 <sup>fg</sup> ± 0,00   | 6,86 <sup>fg</sup> ± 0,02 |
| COGAFT F2   | 0            | 0,66 <sup>h</sup> ± 0,00   | 0,03 <sup>k</sup> ± 0,00 | 0,79 <sup>ghi</sup> ± 0,00  | 7,37 <sup>e</sup> ± 0,04  |
|             | 5            | 0,52 <sup>i</sup> ± 0,00   | 0,08 <sup>j</sup> ± 0,00 | 0,75 <sup>ghij</sup> ± 0,00 | 7,55 <sup>d</sup> ± 0,04  |
| EXTAFT F1   | 0            | 0,27 <sup>jk</sup> ± 0,01  | 0,06 <sup>j</sup> ± 0,00 | 0,84 <sup>gh</sup> ± 0,01   | 7,51 <sup>d</sup> ± 0,07  |
|             | 5            | 0,21 <sup>kl</sup> ± 0,01  | <LQ                      | 0,80 <sup>ghi</sup> ± 0,01  | 7,78 <sup>c</sup> ± 0,02  |
| EXTAFT F2   | 0            | 0,16 <sup>lm</sup> ± 0,02  | <LQ                      | 0,70 <sup>ghij</sup> ± 0,01 | 7,24 <sup>e</sup> ± 0,00  |
|             | 5            | 0,12 <sup>m</sup> ± 0,01   | <LQ                      | 0,62 <sup>hijk</sup> ± 0,01 | 6,81 <sup>g</sup> ± 0,19  |

Nota 1: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; COGAFT F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; COGAFT F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; EXTAFT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação; EXTAFT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação.

Nota 2: valores expressos em média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Fischer LSD.

É importante notar que a fermentação padrão não teve produção alcóolica em 24h decorridas. A produção de etanol em COG F1 e F2 e ainda mais acelerada em EXT F1 e F2 pode ser uma característica interessante para a indústria, visto que o etanol inibe o crescimento de outros microrganismos concorrentes e favorece a levedura que tem um metabolismo com alta tolerância a ele.

Contudo, é necessário verificar se o alto consumo de açúcares nas primeiras horas da fermentação não interfere na formação aromática e na complexidade de sabores da bebida.

### 3.3.3.2 *Resultados de toxicidade em Artemia salina das sidras com e sem adições de cogumelo*

Os resultados para o ensaio de toxicidade biológica utilizando *A. salina* estão apresentados na Tabela 11 em  $DL_{50} \pm$  desvio padrão. Com exceção da fermentação EXTAF5, C15 e os valores do mosto e do extrato que não apresentam toxicidade, todas as fermentações apresentaram valores baixos de toxicidade segundo McLaughlin, Chang e Smith (1993), onde valores abaixo de 100  $\mu\text{g/mL}$  são classificados com alta toxicidade, entre 100 e 500 são de toxicidade moderada, acima de 500 tem baixa toxicidade e acima de 1000 já são considerados atóxicos. Em estudo de Parra *et al.*, (2001) foi avaliado o coeficiente de correlação entre a análise de toxicidade com *A. salina* e a toxicidade oral em ratos, chegando a um valor de 0,85.

Ainda assim, estudos com *A. salina* são preditivos e preliminares, visto a complexidade do corpo humano. Observada uma toxicidade nos fermentados, mesmo que classificada como baixa, foi determinada a suspensão das análises sensoriais, anteriormente listadas no plano de trabalho.

Tabela 11. Valores de DL50 para as fermentações, extrato e mosto

| <b>Amostra</b>    | <b>DL<sub>50</sub> (uL/mL) ± desvio padrão</b> |
|-------------------|------------------------------------------------|
| Extrato otimizado | 1379 ± 504                                     |
| C15               | 2097 ± 192                                     |
| Mosto             | 2781 ± 189                                     |
| EXT15             | 1119 ± 271                                     |
| COG15             | 590 ± 315                                      |
| ML15              | 968 ± 170                                      |
| COGAFT5           | 1094 ± 208                                     |
| EXTAFT5           | 1614 ± 353                                     |

Nota: C 15: média dos resultados dos controles F1 e F2 no dia 15; EXT 15: média dos resultados das sidras adicionadas de extrato F1 e F2 no dia 15; COG 15: média dos resultados das sidras adicionadas de cogumelo F1 e F2 no dia 15; ML 15: resultado da sidra adicionada de meio líquido no dia 15; COGAFT5: média dos resultados das sidras adicionadas de cogumelo após fermentação inicial, medidos no último dia da fermentação (dia 5 da adição e dia 17 da fermentação); EXTAFT5: média dos resultados das sidras adicionadas de extrato após fermentação inicial, medidos no último dia da fermentação (dia 5 da adição e dia 17 da fermentação).

### 3.3.3.3 *Resultados das análises de compostos fenólicos totais e antioxidantes*

Nesta seção estão apresentados os dados de fenólicos totais e análises antioxidantes ABTS, FRAP e DPPH para as fermentações e o extrato otimizado (Tabela 12). A análise estatística foi realizada comparando a mudança dos valores entre os dias da mesma fermentação, ou seja, nesta seção observa-se como os valores se alteraram ao longo da fermentação. A seção 3.3.3 é dedicada à comparação de compostos fenólicos totais e antioxidantes entre as fermentações.

Nas fermentações controle, foi possível observar um comportamento de diminuição dos compostos fenólicos totais ao longo do período de 15 dias. No controle F1, a diminuição foi de aproximadamente 30% e na F2 de 26%. Segundo o estudo de Silva *et al.* (2019), este comportamento é normal na fermentação de maçãs do tipo Gala, Lis Gala e Fuji Suprema, tendo encontrado reduções entre 17 e 50% no teor de fenólicos totais.

Nas fermentações adicionadas de cogumelo seco (COG F1 e COG F2), observa-se um aumento inicial dos fenólicos totais nos primeiros dias, seguido então de uma diminuição. Isso pode ocorrer pois a extração desses compostos ocorreu no próprio mosto, durante os dias da fermentação, desta forma, a interação entre o cogumelo e o mosto, prolongou a extração, para depois ocorrer a diminuição observada na fermentação controle.

Tabela 12. Progressão de compostos fenólicos totais e potenciais antioxidantes durante os dias das fermentações Controle, COG, EXT, COGAFT e EXTAFIT  
(continua)

| Amostra     | Dia da fermentação | TFC (mgEAG/L)                     | DPPH ( $\mu\text{molET/L}$ )       | ABTS ( $\mu\text{molET/L}$ )       | FRAP ( $\mu\text{molET/L}$ )       |
|-------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| EXT OTM     | -                  | 621,67 $\pm$ 35,95                | 1461,06 $\pm$ 145,02               | 1148 $\pm$ 51,61                   | 1329,72 $\pm$ 110,97               |
| Controle F1 | 0                  | 391,89 <sup>ef</sup> $\pm$ 30,22  | 1822,82 <sup>a</sup> $\pm$ 96,10   | 2305,88 <sup>b</sup> $\pm$ 46,04   | 1009,58 <sup>a</sup> $\pm$ 235,15  |
|             | 1                  | 406,43 <sup>ce</sup> $\pm$ 41,43  | 1634,78 <sup>ab</sup> $\pm$ 53,63  | 2322,56 <sup>ab</sup> $\pm$ 139,26 | 1132,5 <sup>a</sup> $\pm$ 210,27   |
|             | 2                  | 472,5 <sup>b</sup> $\pm$ 38,94    | 1770,53 <sup>ab</sup> $\pm$ 140,79 | 2944,53 <sup>c</sup> $\pm$ 23,76   | 1192,92 <sup>a</sup> $\pm$ 57,49   |
|             | 3                  | 451,07 <sup>bc</sup> $\pm$ 33,28  | 1625,94 <sup>ab</sup> $\pm$ 201,37 | 2812,58 <sup>c</sup> $\pm$ 36,43   | 1313,75 <sup>a</sup> $\pm$ 139,67  |
|             | 7                  | 368,93 <sup>ef</sup> $\pm$ 109,53 | 1601,34 <sup>ab</sup> $\pm$ 72,45  | 2860,56 <sup>c</sup> $\pm$ 170,50  | 1136,68 <sup>a</sup> $\pm$ 103,30  |
|             | 10                 | 343,93 <sup>df</sup> $\pm$ 62,97  | 1541,29 <sup>a</sup> $\pm$ 94,33   | 2332,84 <sup>ab</sup> $\pm$ 152,36 | 1076,25 <sup>a</sup> $\pm$ 216,81  |
|             | 11                 | 308,21 <sup>d</sup> $\pm$ 38,18   | 1656,70 <sup>ab</sup> $\pm$ 262,28 | 2500,75 <sup>a</sup> $\pm$ 192,25  | 1351,25 <sup>a</sup> $\pm$ 131,12  |
|             | 15                 | 231,43 <sup>a</sup> $\pm$ 33,23   | 1674,75 <sup>ab</sup> $\pm$ 86,47  | 2810,87 <sup>c</sup> $\pm$ 98,29   | 1299,17 <sup>a</sup> $\pm$ 450,05  |
| Controle F2 | 0                  | 391,89 <sup>c</sup> $\pm$ 30,22   | 1822,82 <sup>a</sup> $\pm$ 96,10   | 2305,88 <sup>a</sup> $\pm$ 46,04   | 1009,58 <sup>a</sup> $\pm$ 235,15  |
|             | 1                  | 455,24 <sup>ab</sup> $\pm$ 56,72  | 2201,77 <sup>a</sup> $\pm$ 760,43  | 2835,43 <sup>c</sup> $\pm$ 50,77   | 1663,75 <sup>b</sup> $\pm$ 180,71  |
|             | 2                  | 486,19 <sup>a</sup> $\pm$ 42,06   | 2061,43 <sup>a</sup> $\pm$ 938,90  | 2852,26 <sup>c</sup> $\pm$ 16,78   | 1655,42 <sup>b</sup> $\pm$ 115,35  |
|             | 3                  | 431,43 <sup>bc</sup> $\pm$ 44,95  | 1984,58 <sup>a</sup> $\pm$ 867,1   | 2822,48 <sup>c</sup> $\pm$ 87,82   | 1530,42 <sup>b</sup> $\pm$ 205,52  |
|             | 7                  | 248,1 <sup>d</sup> $\pm$ 8,25     | 2054,75 <sup>a</sup> $\pm$ 634,42  | 2650,27 <sup>b</sup> $\pm$ 194,17  | 1784,58 <sup>b</sup> $\pm$ 95,35   |
|             | 10                 | 302,86 <sup>d</sup> $\pm$ 72,37   | 1977,90 <sup>a</sup> $\pm$ 903,91  | 2669,69 <sup>b</sup> $\pm$ 111,33  | 1399,17 <sup>ab</sup> $\pm$ 147,43 |
|             | 11                 | 281,43 <sup>d</sup> $\pm$ 14,29   | 1854,27 <sup>a</sup> $\pm$ 760,60  | 2726,66 <sup>bc</sup> $\pm$ 132,37 | 1630,42 <sup>b</sup> $\pm$ 143,59  |
|             | 15                 | 290,95 <sup>d</sup> $\pm$ 34,60   | 1637,08 <sup>a</sup> $\pm$ 668,83  | 2769,39 <sup>bc</sup> $\pm$ 127,66 | 1792,92 <sup>b</sup> $\pm$ 120,06  |
| COG F1      | 0                  | 633,21 <sup>a</sup> $\pm$ 35,61   | 1849,00 <sup>a</sup> $\pm$ 36,51   | 2675,42 <sup>e</sup> $\pm$ 122,84  | 1232,5 <sup>c</sup> $\pm$ 165,13   |
|             | 1                  | 976,07 <sup>b</sup> $\pm$ 44,36   | 1917,15 <sup>a</sup> $\pm$ 95,49   | 2637,82 <sup>e</sup> $\pm$ 99,69   | 1222,08 <sup>c</sup> $\pm$ 228,56  |
|             | 2                  | 981,43 <sup>b</sup> $\pm$ 22,18   | 1449,99 <sup>c</sup> $\pm$ 166,77  | 3468,93 <sup>bc</sup> $\pm$ 45,85  | 1547,08 <sup>bd</sup> $\pm$ 124,42 |
|             | 3                  | 933,21 <sup>b</sup> $\pm$ 26,18   | 1404,46 <sup>c</sup> $\pm$ 60,28   | 3277,24 <sup>c</sup> $\pm$ 104,29  | 1428,33 <sup>bc</sup> $\pm$ 139,03 |
|             | 7                  | 781,43 <sup>cd</sup> $\pm$ 25,82  | 957,65 <sup>b</sup> $\pm$ 370,58   | 3657,49 <sup>ab</sup> $\pm$ 79,68  | 1726,25 <sup>d</sup> $\pm$ 83,16   |

Tabela 12. Progressão de compostos fenólicos totais e potenciais antioxidantes durante os dias das fermentações Controle, COG, EXT, COGAFT e EXTAFT (continua)

| Amostra | Dia da fermentação | TFC (mgEAG/L)                     | DPPH ( $\mu\text{molET/L}$ )       | ABTS ( $\mu\text{molET/L}$ )       | FRAP ( $\mu\text{molET/L}$ )        |
|---------|--------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
|         | 10                 | 738,57 <sup>d</sup> $\pm$ 20,82   | 1172,38 <sup>bc</sup> $\pm$ 330,92 | 2812,58 <sup>de</sup> $\pm$ 155,42 | 1630,42 <sup>bd</sup> $\pm$ 100,78  |
|         | 11                 | 806,43 <sup>c</sup> $\pm$ 45,46   | 1132,37 <sup>bc</sup> $\pm$ 336,24 | 2886,26 <sup>d</sup> $\pm$ 142,06  | 1717,92 <sup>d</sup> $\pm$ 27,53    |
|         | 15                 | 776,07 <sup>cd</sup> $\pm$ 65,61  | 1134,20 <sup>bc</sup> $\pm$ 395,34 | 3772,07 <sup>a</sup> $\pm$ 241,16  | 2030,41 <sup>a</sup> $\pm$ 407,30   |
| COG F2  | 0                  | 633,21 <sup>e</sup> $\pm$ 35,61   | 2227,39 <sup>b</sup> $\pm$ 442,76  | 2675,42 <sup>bd</sup> $\pm$ 122,84 | 1232,5 <sup>a</sup> $\pm$ 165,13    |
|         | 1                  | 829,64 <sup>b</sup> $\pm$ 18,70   | 1993,49 <sup>b</sup> $\pm$ 894,29  | 2620,69 <sup>bcd</sup> $\pm$ 38,56 | 1665,83 <sup>abc</sup> $\pm$ 122,66 |
|         | 2                  | 854,64 <sup>b</sup> $\pm$ 30,30   | 1996,28 <sup>b</sup> $\pm$ 306,70  | 2594,99 <sup>cd</sup> $\pm$ 94,47  | 1938,06 <sup>c</sup> $\pm$ 193,17   |
|         | 3                  | 670,71 <sup>de</sup> $\pm$ 26,38  | 1703,91 <sup>ab</sup> $\pm$ 306,70 | 2284,87 <sup>a</sup> $\pm$ 190,21  | 1317,92 <sup>ab</sup> $\pm$ 115,75  |
|         | 7                  | 779,64 <sup>a</sup> $\pm$ 26,45   | 993,87 <sup>a</sup> $\pm$ 446,73   | 2702,93 <sup>bd</sup> $\pm$ 84,38  | 1809,58 <sup>bc</sup> $\pm$ 213,37  |
|         | 10                 | 717,14 <sup>c</sup> $\pm$ 79,15   | 1436,60 <sup>ab</sup> $\pm$ 692,21 | 2612,12 <sup>cd</sup> $\pm$ 96,36  | 1834,58 <sup>bc</sup> $\pm$ 110,21  |
|         | 11                 | 681,43 <sup>cde</sup> $\pm$ 37,80 | 1898,82 <sup>b</sup> $\pm$ 360,78  | 2397,95 <sup>ac</sup> $\pm$ 69,53  | 1992,92 <sup>c</sup> $\pm$ 349,76   |
|         | 15                 | 727,14 <sup>cd</sup> $\pm$ 70,35  | 1948,94 <sup>b</sup> $\pm$ 628,30  | 2906,82 <sup>b</sup> $\pm$ 181,71  | 1999,17 <sup>c</sup> $\pm$ 330,89   |
| EXT F1  | 0                  | 362,98 <sup>ab</sup> $\pm$ 26,21  | 1878,87 <sup>d</sup> $\pm$ 429,18  | 2174,67 <sup>de</sup> $\pm$ 99,06  | 1180,42 <sup>a</sup> $\pm$ 80,62    |
|         | 1                  | 382,02 <sup>a</sup> $\pm$ 27,73   | 1931,36 <sup>d</sup> $\pm$ 119,76  | 1575,54 <sup>b</sup> $\pm$ 128,30  | 959,58 <sup>b</sup> $\pm$ 149,28    |
|         | 2                  | 324,29 <sup>abc</sup> $\pm$ 37,75 | 1992,78 <sup>d</sup> $\pm$ 194,67  | 2632,57 <sup>c</sup> $\pm$ 188,69  | 830,42 <sup>b</sup> $\pm$ 23,94     |
|         | 3                  | 354,64 <sup>ab</sup> $\pm$ 29,33  | 1743,86 <sup>d</sup> $\pm$ 449,21  | 2053,56 <sup>e</sup> $\pm$ 188,69  | 957,50 <sup>b</sup> $\pm$ 139,19    |
|         | 7                  | 329,64 <sup>abc</sup> $\pm$ 41,12 | 1890,06 <sup>d</sup> $\pm$ 149,16  | 2053,56 <sup>e</sup> $\pm$ 115,09  | 1004,72 <sup>ab</sup> $\pm$ 221,94  |
|         | 10                 | 286,79 <sup>c</sup> $\pm$ 25,33   | 1468,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 68,29  | 2307,14 <sup>d</sup> $\pm$ 109,80  | 1004,72 <sup>ab</sup> $\pm$ 184,34  |
|         | 11                 | 308,21 <sup>bc</sup> $\pm$ 39,81  | 1138,15 <sup>bc</sup> $\pm$ 236,42 | 2544,20 <sup>c</sup> $\pm$ 230,23  | 930,42 <sup>b</sup> $\pm$ 45,33     |
|         | 15                 | 281,43 <sup>c</sup> $\pm$ 76,53   | 938,42 <sup>c</sup> $\pm$ 127,32   | 2836,57 <sup>a</sup> $\pm$ 101,86  | 982,50 <sup>b</sup> $\pm$ 46,40     |
| EXT F2  | 0                  | 362,98 <sup>a</sup> $\pm$ 26,21   | 1687,20 <sup>b</sup> $\pm$ 159,37  | 2174,67 <sup>a</sup> $\pm$ 99,06   | 1180,42 <sup>a</sup> $\pm$ 80,62    |
|         | 1                  | 303,33 <sup>bc</sup> $\pm$ 49,86  | 1263,96 <sup>bc</sup> $\pm$ 310,01 | 2005,59 <sup>ab</sup> $\pm$ 113,72 | 918,61 <sup>abc</sup> $\pm$ 70,87   |
|         | 2                  | 333,93 <sup>ab</sup> $\pm$ 18,63  | 1358,64 <sup>bc</sup> $\pm$ 106,10 | 2151,23 <sup>a</sup> $\pm$ 128,02  | 1029,72 <sup>abc</sup> $\pm$ 148,21 |
|         | 3                  | 245,71 <sup>f</sup> $\pm$ 34,10   | 1224,98 <sup>bc</sup> $\pm$ 310,01 | 1779,43 <sup>b</sup> $\pm$ 59,35   | 807,50 <sup>c</sup> $\pm$ 36,32     |
|         | 7                  | 288,21 <sup>cd</sup> $\pm$ 12,78  | 1265,36 <sup>bc</sup> $\pm$ 661,75 | 1825,12 <sup>b</sup> $\pm$ 82,34   | 854,72 <sup>bc</sup> $\pm$ 17,35    |

Tabela 12. Progressão de compostos fenólicos totais e potenciais antioxidantes durante os dias das fermentações Controle, COG, EXT, COGAFT e EXTAFT (continua)

| Amostra   | Dia da fermentação | TFC (mgEAG/L)                    | DPPH ( $\mu\text{mol ET/L}$ )      | ABTS ( $\mu\text{mol ET/L}$ )      | FRAP ( $\mu\text{mol ET/L}$ )       |
|-----------|--------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
|           | 10                 | 252,86 <sup>df</sup> $\pm$ 36,14 | 1035,64 <sup>ac</sup> $\pm$ 163,01 | 2037,57 <sup>ab</sup> $\pm$ 178,76 | 982,50 <sup>abc</sup> $\pm$ 80,36   |
|           | 11                 | 195,71 <sup>e</sup> $\pm$ 24,74  | 1202,71 <sup>bc</sup> $\pm$ 589,73 | 1813,69 <sup>b</sup> $\pm$ 94,22   | 949,167 <sup>abc</sup> $\pm$ 124,91 |
|           | 15                 | 231,48 <sup>ef</sup> $\pm$ 3,60  | 700,83 <sup>a</sup> $\pm$ 36,12    | 1996,45 <sup>ab</sup> $\pm$ 24,07  | 1126,94 <sup>ab</sup> $\pm$ 170,85  |
| COGAFT F1 | 0                  | 571,9 <sup>b</sup> $\pm$ 30,86   | 1676,06 <sup>c</sup> $\pm$ 25,52   | 2276,3 <sup>b</sup> $\pm$ 79,63    | 1465,83 <sup>b</sup> $\pm$ 280,95   |
|           | 2                  | 912,38 <sup>c</sup> $\pm$ 135,35 | 1954,51 <sup>bc</sup> $\pm$ 289,76 | 2694,36 <sup>a</sup> $\pm$ 55,25   | 1659,58 <sup>bc</sup> $\pm$ 220,83  |
|           | 3                  | 905,24 <sup>c</sup> $\pm$ 78,59  | 2762,00 <sup>a</sup> $\pm$ 92,01   | 2430,50 <sup>b</sup> $\pm$ 116,91  | 1601,25 <sup>b</sup> $\pm$ 107,66   |
|           | 5                  | 776,67 <sup>a</sup> $\pm$ 57,62  | 2493,30 <sup>ab</sup> $\pm$ 692,26 | 2633,82 <sup>a</sup> $\pm$ 48,62   | 2017,92 <sup>a</sup> $\pm$ 134,61   |
| COGAFT F2 | 0                  | 900,48 <sup>b</sup> $\pm$ 95,12  | 2388,89 <sup>a</sup> $\pm$ 640,55  | 3583,84 <sup>a</sup> $\pm$ 119,90  | 2111,67 <sup>b</sup> $\pm$ 125      |
|           | 1                  | 929,05 <sup>b</sup> $\pm$ 69,79  | 2447,36 <sup>a</sup> $\pm$ 600,59  | 3604,55 <sup>a</sup> $\pm$ 198,30  | 2022,083 <sup>b</sup> $\pm$ 221,46  |
|           | 3                  | 944,29 <sup>b</sup> $\pm$ 27,84  | 1724,68 <sup>a</sup> $\pm$ 68,81   | 3292,4 <sup>b</sup> $\pm$ 220,40   | 2063,75 <sup>b</sup> $\pm$ 153,72   |
|           | 5                  | 750,48 <sup>a</sup> $\pm$ 57,67  | 1936,63 <sup>a</sup> $\pm$ 644,45  | 3174,28 <sup>b</sup> $\pm$ 174,41  | 1554,72 <sup>a</sup> $\pm$ 166,74   |
| EXTAFT F1 | 0                  | 635,00 <sup>a</sup> $\pm$ 117,44 | 2717,45 <sup>a</sup> $\pm$ 19,29   | 2290,01 <sup>a</sup> $\pm$ 142,28  | 1751,94 <sup>a</sup> $\pm$ 503,90   |
|           | 2                  | 510,00 <sup>a</sup> $\pm$ 37,80  | 1373,95 <sup>c</sup> $\pm$ 37,04   | 2471,62 <sup>a</sup> $\pm$ 121,25  | 1032,5 <sup>a</sup> $\pm$ 158,99    |
|           | 3                  | 527,86 <sup>ab</sup> $\pm$ 45,74 | 1461,66 <sup>c</sup> $\pm$ 77,77   | 2449,35 <sup>a</sup> $\pm$ 63,15   | 1351,94 <sup>a</sup> $\pm$ 146,32   |
|           | 5                  | 576,67 <sup>ab</sup> $\pm$ 29,74 | 1191,57 <sup>b</sup> $\pm$ 144,04  | 2405,37 <sup>a</sup> $\pm$ 109,30  | 1632,5 <sup>a</sup> $\pm$ 202,07    |

Tabela 12. Progressão de compostos fenólicos totais e potenciais antioxidantes durante os dias das fermentações Controle, COG, EXT, COGAFT e EXTAF2T (conclusão)

| Amostra    | Dia da fermentação | TFC (mgEAG/L)                   | DPPH ( $\mu\text{molET/L}$ )       | ABTS ( $\mu\text{molET/L}$ )      | FRAP ( $\mu\text{molET/L}$ )      |
|------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| EXTAF2T F2 | 0                  | 615,00 <sup>a</sup> $\pm$ 51,34 | 3758,84 <sup>a</sup> $\pm$ 145,65  | 2739,61 <sup>b</sup> $\pm$ 128,45 | 1390,83 <sup>ab</sup> $\pm$ 28,87 |
|            | 1                  | 600,71 <sup>a</sup> $\pm$ 39,34 | 2828,83 <sup>ab</sup> $\pm$ 67,52  | 2742,2 <sup>b</sup> $\pm$ 155,90  | 1446,39 <sup>ab</sup> $\pm$ 61,43 |
|            | 3                  | 611,43 <sup>a</sup> $\pm$ 18,44 | 1837,56 <sup>d</sup> $\pm$ 676,71  | 2819,89 <sup>b</sup> $\pm$ 82,91  | 1551,94 <sup>a</sup> $\pm$ 243,86 |
|            | 5                  | 569,52 <sup>a</sup> $\pm$ 20,59 | 1999,54 <sup>cd</sup> $\pm$ 664,88 | 2566,01 <sup>a</sup> $\pm$ 97,23  | 1232,5 <sup>b</sup> $\pm$ 101,04  |

Nota 1: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; COGAFT F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; COGAFT F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; EXTAF2T F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação; EXTAF2T F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação.

Nota 2: valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e na mesma amostra significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Fischer LSD.

Nas fermentações EXT F1 e F2, os valores inicial e final de compostos fenólicos totais se assemelham a fermentação controle, porém, durante a fermentação pode-se observar a prevalência de valores mais baixos na fermentação adicionada de extrato.

A adição do cogumelo e do extrato após os 12 dias de fermentação resulta em valores maiores de compostos fenólicos. Na fermentação COGAFT F1 e F2, a presença de um maior teor de etanol, tendo em vista que a fermentação já se encontrava no 12º dia, potencializou a extração de fenólicos totais do cogumelo seco. Esta extração de compostos aconteceu desde o dia 0 (na adição) até o dia 3; entre os dias 4 e 5, os valores diminuíram, o que indica o uso ou a biotransformação destes compostos na fermentação.

Nas fermentações EXTAF1 F1 e F2, a adição ocorreu no dia 0, que resulta em um aumento do teor de fenólicos, porém, ao longo dos próximos dias não houve diferença significativa, ou seja, não houve ou não foi possível perceber uma diminuição neste período observado.

Em relação aos antioxidantes, a fermentação controle não mostra alteração significativa durante a fermentação no DPPH e no FRAP. Em relação ao ABTS, é possível observar maiores flutuações no mesmo período.

Os resultados de DPPH na fermentação COG F1 e F2 demonstra também uma flutuação, ou seja, a capacidade antioxidante aumenta e diminui durante a fermentação. A partir das análises realizadas não é possível confirmar se essas flutuações acontecem devido a utilização de compostos pelas leveduras, pela degradação ou biotransformação de compostos ou até mesmo se a massa de cogumelo seco, após a liberação de compostos pode ter atuado como uma “rede” e segurado estes compostos, dependendo da osmolaridade do meio fermentativo.

Nas fermentações EXT F1 e F2, o comportamento flutuante visto nas fermentações COG não se repete. Observa-se de forma geral uma diminuição mais linear da atividade antioxidante da sidra. Os valores finais de DPPH na fermentação EXT F1 e F2 foram os menores entre as fermentações.

Da mesma forma, nas fermentações COGAFT, percebe-se um comportamento flutuante, ora tendo um aumento em relação ao dia da adição e ora tendo as quantidades mantidas sem diferença significativa. Isso está em oposição ao comportamento de EXTAF1, que tanto em F1 quanto em F2 tem diminuições na capacidade antioxidante, apesar do aumento inicial durante a adição do extrato.

Em relação à análise de ABTS, praticamente todas as fermentações demonstram comportamento flutuante, com exceção das fermentações EXTAFT F1 e F2 que ou não tem alterações significativas, ou demonstram comportamento decrescente ao final da fermentação.

#### 3.3.3.4 *Resultados comparados de TPC e antioxidantes*

Nesta seção apresentam-se os dados de fenólicos totais (TPC) e antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP) comparados entre as fermentações nos dias 0, 1 e 15 para as fermentações regulares e 0 e 5 para as fermentações AFT (Tabela 13).

Em relação aos compostos fenólicos, com exceção das fermentações EXT e EXTAFT, todas apresentam diferença significativa entre o dia inicial e final. Os maiores valores foram obtidos com adição do cogumelo, porém, a extração dos compostos acontece logo nas primeiras 24h e depois estes compostos são parcialmente utilizados, diminuindo os teores até o final da fermentação.

Em relação aos compostos fenólicos totais nos últimos dias de fermentação, ou seja, no ponto final, os maiores valores estão nas fermentações COG F1 e F2 e COGAFT F1 e F2.

De forma geral, os maiores valores de TPC e antioxidantes foram obtidos a partir da adição do cogumelo. Isto significa que este procedimento acentuou a atividade antioxidante e o teor de fenólicos na sidra. Porém, durante a fermentação esses compostos progressivamente diminuíram e na maior parte dos dados observados nos últimos dias de fermentação não houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) ou houve diminuição. Com exceção de COGAFT F2, que teve teores de ABTS e FRAP significativamente maiores. A diminuição de compostos fenólicos totais na sidra já foi observada por Alberti *et al.* (2016) e Benvenuti *et al.* (2019).

Os processos para obtenção da sidra podem causar perda de compostos fenólicos e antioxidantes, principalmente durante a despectinização e por oxidação enzimática (Zardo *et al.*, 2008).

Tabela 13. Comparativo de fenólicos e potencial antioxidantes nos dias 0, 1 e 15 das fermentações controle, COG e EXT e 0 e 5 nas fermentações EXT. (continua)

| Amostra     | Dia | TPC (mgEAG/L)                     | DPPH ( $\mu\text{molET/L}$ )          | ABTS ( $\mu\text{molET/L}$ )         | FRAP ( $\mu\text{molET/L}$ )           |
|-------------|-----|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| EXT OTM     | -   | 621,67 <sup>e</sup> $\pm$ 35,95   | 1461,06 <sup>efghi</sup> $\pm$ 145,02 | 1148 <sup>j</sup> $\pm$ 51,61        | 1329,72 <sup>bcdef</sup> $\pm$ 110,97  |
| Controle F1 | 0   | 391,89 <sup>fg</sup> $\pm$ 30,22  | 1822,82 <sup>cdefg</sup> $\pm$ 96,10  | 2305,88 <sup>fgh</sup> $\pm$ 46,04   | 1009,58 <sup>ef</sup> $\pm$ 235,15     |
|             | 1   | 406,43 <sup>fg</sup> $\pm$ 41,43  | 1634,78 <sup>defgh</sup> $\pm$ 53,63  | 2322,56 <sup>efgh</sup> $\pm$ 139,26 | 1132,5 <sup>def</sup> $\pm$ 210,27     |
|             | 15  | 231,43 <sup>j</sup> $\pm$ 33,23   | 1674,75 <sup>defgh</sup> $\pm$ 86,47  | 2810,87 <sup>bc</sup> $\pm$ 98,29    | 1299,17 <sup>cdef</sup> $\pm$ 450,05   |
| Controle F2 | 0   | 391,89 <sup>fg</sup> $\pm$ 30,22  | 1822,82 <sup>cdefg</sup> $\pm$ 96,10  | 2305,88 <sup>fgh</sup> $\pm$ 46,04   | 1009,58 <sup>ef</sup> $\pm$ 235,15     |
|             | 1   | 455,24 <sup>f</sup> $\pm$ 56,72   | 2201,77 <sup>bcd</sup> $\pm$ 760,43   | 2835,43 <sup>bc</sup> $\pm$ 50,77    | 1663,75 <sup>abcde</sup> $\pm$ 180,71  |
|             | 15  | 290,95 <sup>ij</sup> $\pm$ 34,60  | 1637,08 <sup>defgh</sup> $\pm$ 668,83 | 2769,39 <sup>cd</sup> $\pm$ 127,66   | 1792,92 <sup>abcd</sup> $\pm$ 120,06   |
| COG F1      | 0   | 633,21 <sup>e</sup> $\pm$ 35,61   | 1849,00 <sup>cdefg</sup> $\pm$ 36,51  | 2675,42 <sup>cde</sup> $\pm$ 122,84  | 1232,5 <sup>def</sup> $\pm$ 165,13     |
|             | 1   | 976,07 <sup>a</sup> $\pm$ 44,36   | 1917,15 <sup>cdef</sup> $\pm$ 95,49   | 2637,82 <sup>cdef</sup> $\pm$ 99,69  | 1222,08 <sup>c</sup> $\pm$ 228,56      |
|             | 15  | 776,07 <sup>cd</sup> $\pm$ 65,61  | 1134,20 <sup>hij</sup> $\pm$ 395,34   | 3772,07 <sup>a</sup> $\pm$ 241,16    | 2030,41 <sup>ab</sup> $\pm$ 407,30     |
| COG F2      | 0   | 633,21 <sup>e</sup> $\pm$ 35,61   | 2227,39 <sup>bcd</sup> $\pm$ 442,76   | 2675,42 <sup>cde</sup> $\pm$ 122,84  | 1232,5 <sup>a</sup> $\pm$ 165,13       |
|             | 1   | 829,64 <sup>bc</sup> $\pm$ 18,70  | 1993,49 <sup>cde</sup> $\pm$ 894,29   | 2620,69 <sup>cdef</sup> $\pm$ 38,56  | 1665,83 <sup>abcde</sup> $\pm$ 122,66  |
|             | 15  | 727,14 <sup>d</sup> $\pm$ 70,35   | 1948,94 <sup>cdef</sup> $\pm$ 628,30  | 2906,82 <sup>bc</sup> $\pm$ 181,71   | 1999,17 <sup>abc</sup> $\pm$ 330,89    |
| EXT F1      | 0   | 362,98 <sup>ghi</sup> $\pm$ 26,21 | 1878,87 <sup>cdefg</sup> $\pm$ 429,18 | 2174,67 <sup>gh</sup> $\pm$ 99,06    | 1180,42 <sup>def</sup> $\pm$ 80,62     |
|             | 1   | 382,02 <sup>fgh</sup> $\pm$ 27,73 | 1931,36 <sup>cdef</sup> $\pm$ 119,76  | 1575,54 <sup>i</sup> $\pm$ 128,30    | 959,58 <sup>ef</sup> $\pm$ 149,28      |
|             | 15  | 281,43 <sup>ij</sup> $\pm$ 76,53  | 938,42 <sup>j</sup> $\pm$ 127,32      | 2836,57 <sup>bc</sup> $\pm$ 101,86   | 982,50 <sup>ef</sup> $\pm$ 46,40       |
| EXT F2      | 0   | 362,98 <sup>ghi</sup> $\pm$ 26,21 | 1687,20 <sup>defgh</sup> $\pm$ 159,37 | 2174,67 <sup>gh</sup> $\pm$ 99,06    | 1180,42 <sup>def</sup> $\pm$ 80,62     |
|             | 1   | 303,33 <sup>hij</sup> $\pm$ 49,86 | 1263,96 <sup>fghij</sup> $\pm$ 310,01 | 2005,59 <sup>h</sup> $\pm$ 113,72    | 918,61 <sup>f</sup> $\pm$ 70,87        |
|             | 15  | 231,48 <sup>j</sup> $\pm$ 3,60    | 700,83 <sup>i</sup> $\pm$ 36,12       | 1996,45 <sup>h</sup> $\pm$ 24,07     | 1126,94 <sup>def</sup> $\pm$ 170,85    |
| COGAFT F1   | 0   | 571,9 <sup>e</sup> $\pm$ 30,86    | 1676,06 <sup>defgh</sup> $\pm$ 25,52  | 2276,3 <sup>fgh</sup> $\pm$ 79,63    | 1465,83 <sup>abcdef</sup> $\pm$ 280,95 |
|             | 5   | 776,67 <sup>cd</sup> $\pm$ 57,62  | 2493,30 <sup>bc</sup> $\pm$ 692,26    | 2633,82 <sup>cdef</sup> $\pm$ 48,62  | 2017,92 <sup>ab</sup> $\pm$ 134,61     |
| COGAFT F2   | 0   | 900,48 <sup>ab</sup> $\pm$ 95,12  | 2388,89 <sup>bc</sup> $\pm$ 640,55    | 3583,84 <sup>a</sup> $\pm$ 119,90    | 2111,67 <sup>a</sup> $\pm$ 125         |
|             | 5   | 750,48 <sup>cd</sup> $\pm$ 57,67  | 1936,63 <sup>cdef</sup> $\pm$ 644,45  | 3174,28 <sup>b</sup> $\pm$ 174,41    | 1554,72 <sup>abcdef</sup> $\pm$ 166,74 |

Tabela 13. Comparativo de fenólicos e potencial antioxidantes nos dias 0, 1 e 15 das fermentações controle, COG e EXT e 0 e 5 nas fermentações EXT.  
(conclusão)

| Amostra   | Dia | TPC (mgEAG/L)                    | DPPH ( $\mu\text{molET/L}$ )         | ABTS ( $\mu\text{molET/L}$ )         | FRAP ( $\mu\text{molET/L}$ )         |
|-----------|-----|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| EXTAFT F1 | 0   | 635,00 <sup>e</sup> $\pm$ 117,44 | 2717,45 <sup>b</sup> $\pm$ 19,29     | 2290,01 <sup>gh</sup> $\pm$ 142,28   | 1751,94 <sup>abcd</sup> $\pm$ 503,90 |
|           | 5   | 576,67 <sup>e</sup> $\pm$ 29,74  | 1191,57 <sup>ghij</sup> $\pm$ 144,04 | 2405,37 <sup>defg</sup> $\pm$ 109,30 | 1632,5 <sup>abcde</sup> $\pm$ 202,07 |
| EXTAFT F2 | 0   | 615,00 <sup>e</sup> $\pm$ 51,34  | 3758,84 <sup>a</sup> $\pm$ 145,65    | 2739,61 <sup>cd</sup> $\pm$ 128,45   | 1390,83 <sup>bcdef</sup> $\pm$ 28,87 |
|           | 5   | 569,52 <sup>e</sup> $\pm$ 20,59  | 1999,54 <sup>cde</sup> $\pm$ 664,88  | 2566,01 <sup>cdef</sup> $\pm$ 97,23  | 1232,5 <sup>def</sup> $\pm$ 101,04   |

Nota 1: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; COGAFT F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; COGAFT F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; EXTAFT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação; EXTAFT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação.

Nota 2: valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Fischer LSD.

### 3.3.3.5 Resultados da quantificação fenólica individual

Em relação aos fenólicos individuais estudados (ácido gálico, catequina, epicatequina, floridizina, ácido elágico, floretina, ácido clorogênico, ácido cafeico e trans-ferrúlico), somente o ácido clorogênico pode ser quantificado. Isso foi percebido ainda no mosto. É possível que esta cultivar de maçã, por algum problema, inclusive climático, não tenha apresentado teores relevantes destes compostos, visto que em estudos anteriores com a maçã Gala em diferentes estádios de maturação, os mesmos compostos foram detectados e quantificados (Alberti *et al.*, 2016)

O ácido cafeico e trans-ferrúlico ficaram abaixo do limite de quantificação, porém estavam presentes nas amostras. Na Tabela 14 estão apresentados os valores de ácido clorogênico de cada fermentação. O extrato otimizado teve valor de ácido clorogênico abaixo do limite de quantificação.

O ácido clorogênico é um composto fenólico considerado um importante metabólito secundário na maçã. É formado pela condensação do ácido quínico e do ácido cafeico. No estudo de Benvenuti, *et al.* (2019), o ácido cafeico estava presente na sidra em um teor de  $2,16 \text{ mg/L} \pm 0,01$  e o ácido clorogênico em  $27,1 \text{ mg/L} \pm 0,1$ . Neste estudo, observou-se a diminuição do ácido clorogênico ao longo da fermentação, muito provavelmente por uma hidrólise, formando os ácidos cafeico (analisado no experimento) e quínico (não analisado no experimento). Neste estudo, não foram encontrados teores quantificáveis de ácido cafeico, porém o teor de ácido clorogênico ao final da fermentação é maior que os encontrados por Benvenuti ( $34,99 \text{ mg/L} \pm 0,32$  e  $28,53 \text{ mg/L} \pm 0,24$ ) e o comportamento também difere, pois os teores de ácido clorogênico aumentaram ao longo da fermentação, tanto no controle como nas fermentações COG e EXT. Nas fermentações AFT, se observa o contrário; os valores são altos já após 20 minutos da adição do cogumelo ou do extrato (dia 0) e decorridos 5 dias os valores diminuiram.

Teores maiores de ácido clorogênico no mosto já foram encontrados em variedades de maçãs com baixa atividade da enzima polifenol oxidase (Guiné *et al.*, 2021; Coldea *et al.*, 2020). Porém, comportamentos de aumento do ácido clorogênico durante a fermentação da sidra, até onde foi possível verificar, não foram encontrados.

Tabela 14. Teores de ácido clorogênico nas diferentes fermentações.

| Amostra     | Dia da Fermentação | Ácido clorogênico (mg/L)   |
|-------------|--------------------|----------------------------|
| Controle F1 | 0                  | 15,71 <sup>m</sup> ± 0,40  |
|             | 1                  | 24,43 <sup>kl</sup> ± 0,38 |
|             | 15                 | 34,99 <sup>f</sup> ± 0,32  |
| Controle F2 | 0                  | 15,71 <sup>m</sup> ± 0,40  |
|             | 1                  | 23,38 <sup>kl</sup> ± 0,23 |
|             | 15                 | 28,53 <sup>i</sup> ± 0,24  |
| COG F1      | 0                  | 28,52 <sup>i</sup> ± 1,21  |
|             | 1                  | 34,39 <sup>f</sup> ± 0,04  |
|             | 15                 | 49,34 <sup>a</sup> ± 1,00  |
| COG F2      | 0                  | 28,52 <sup>i</sup> ± 0,24  |
|             | 1                  | 34,10 <sup>fg</sup> ± 0,23 |
|             | 15                 | 45,03 <sup>b</sup> ± 0,13  |
| EXT F1      | 0                  | 22,60 <sup>l</sup> ± 0,26  |
|             | 1                  | 25,08 <sup>jk</sup> ± 0,14 |
|             | 15                 | 35,77 <sup>f</sup> ± 0,04  |
| EXT F2      | 0                  | 22,60 <sup>l</sup> ± 0,26  |
|             | 1                  | 24,67 <sup>k</sup> ± 0,03  |
|             | 15                 | 26,92 <sup>ij</sup> ± 0,27 |
| COGAFT F1   | 0                  | 42,94 <sup>c</sup> ± 0,04  |
|             | 5                  | 36,10 <sup>ef</sup> ± 5,96 |
| COGAFT F2   | 0                  | 31,16 <sup>h</sup> ± 0,04  |
|             | 5                  | 28,87 <sup>i</sup> ± 1,35  |
| EXTAFT F1   | 0                  | 39,03 <sup>d</sup> ± 0,01  |
|             | 5                  | 37,97 <sup>de</sup> ± 0,07 |
| EXTAFT F2   | 0                  | 32,31 <sup>gh</sup> ± 0,58 |
|             | 5                  | 31,63 <sup>h</sup> ± 0,23  |

Nota 1: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; COGAFT F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; COGAFT F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; EXTAFT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação; EXTAFT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação.

Nota 2: valores expressos em média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Fischer LSD.

No estudo de Xu *et al.* (2019) realizou-se a adição de glutathione ao mosto de maçãs para fermentação de um fermentado alcoólico de maçã. O estudo demonstrou que a adição desta molécula, que é composta por 3 aminoácidos (glicina, cisteína e ácido glutâmico), ajudou na manutenção do ácido clorogênico durante a fermentação. O estudo não traz os valores de ácido clorogênico no mosto, porém estabeleceu uma comparação entre a fermentação controle e fermentações adicionadas de glutathione e observou-se um aumento de ácido clorogênico progressivamente ao aumento de glutathione adicionada.

Os maiores valores de ácido clorogênico foram encontrados nas fermentações COG F1 e F2, ambas no 15º dia. Os menores valores foram encontrados no mosto (Controle F1 e F2, dia 0). Apesar de o extrato otimizado não ter valores de ácido clorogênico acima do limite de quantificação, pode-se observar que os dias 0 das fermentações COG e EXT ambas tiveram valores maiores que os encontrados no mosto.

Não existem estudos até o momento sobre a influência do ácido clorogênico diretamente no sabor da sidra, porém, os polifenóis como grupo (que inclui o ácido clorogênico), são reconhecidos por modificar propriedades sensoriais como o amargor, a adstringência e a complexidade geral de sabores (Wickland *et al.*, 2020). Neste mesmo trabalho, foram avaliadas diferentes misturas de cultivares para produção de sidra e descobriu-se uma tendência de sidras com maiores composições fenólicas de serem mais mal avaliadas, pois tendem ao amargor e a adstringência. Esta característica foi penalizada em sidras com teores entre 87 e 200 mg/L de ácido clorogênico. Os *blends* com valores entre 13 e 28 mg/L foram melhor avaliados. Valores medianos não foram testados.

#### 3.3.3.6 Resultados de ácidos orgânicos

Foram analisados em HPLC a presença e concentração dos ácidos glucurônico, galacturônico, málico, láctico, acético, isobutírico e butírico. As amostras tiveram valores abaixo do limite de quantificação para os ácidos galacturônico, isobutírico e butírico. As concentrações para os outros ácidos estão demonstradas Tabela 15.

Tabela 15. Quantificação de ácidos orgânicos nas diferentes fermentações.

| Amostra     | Dia da fermentação | Ácido glucurônico (%)       | Ácido málico (%)          | Ácido láctico (%)           | Ácido acético (%)         |
|-------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| EXT OTM     | -                  | 0,59 <sup>a</sup> ± 0,02    | 2,72 <sup>a</sup> ± 0,14  | 0,96 <sup>a</sup> ± 0,03    | <LQ                       |
| Controle F1 | 0                  | <LQ                         | 0,65 <sup>jk</sup> ± 0,00 | 0,10 <sup>g</sup> ± 0,00    | <LQ                       |
|             | 1                  | <LQ                         | 0,67 <sup>ji</sup> ± 0,06 | 0,13 <sup>fg</sup> ± 0,01   | 0,91 <sup>a</sup> ± 0,01  |
|             | 15                 | 0,04 <sup>ef</sup> ± 0,00   | 0,02 <sup>n</sup> ± 0,00  | 0,25 <sup>cdef</sup> ± 0,01 | 0,04 <sup>i</sup> ± 0,01  |
| Controle F2 | 0                  | <LQ                         | 0,65 <sup>jk</sup> ± 0,00 | 0,10 <sup>g</sup> ± 0,00    | <LQ                       |
|             | 1                  | <LQ                         | 0,73 <sup>hi</sup> ± 0,05 | 0,10 <sup>cd</sup> ± 0,01   | <LQ                       |
|             | 15                 | <LQ                         | 0,59 <sup>k</sup> ± 0,03  | 0,10 <sup>g</sup> ± 0,00    | 0,09 <sup>f</sup> ± 0,01  |
| COG F1      | 0                  | <LQ                         | 0,65 <sup>jk</sup> ± 0,00 | 0,10 <sup>g</sup> ± 0,00    | <LQ                       |
|             | 1                  | 0,22 <sup>bc</sup> ± 0,01   | 1,53 <sup>c</sup> ± 0,03  | 0,35 <sup>cd</sup> ± 0,01   | 0,42 <sup>c</sup> ± 0,01  |
|             | 15                 | 0,20 <sup>bcd</sup> ± 0,01  | 1,03 <sup>f</sup> ± 0,05  | 0,37 <sup>cd</sup> ± 0,03   | 0,07 <sup>gh</sup> ± 0,00 |
| COG F2      | 0                  | <LQ                         | 0,65 <sup>gh</sup> ± 0,00 | 0,10 <sup>g</sup> ± 0,00    | <LQ                       |
|             | 1                  | 0,21 <sup>bcd</sup> ± 0,01  | 1,65 <sup>k</sup> ± 0,03  | 0,39 <sup>bc</sup> ± 0,01   | 0,03 <sup>i</sup> ± 0,00  |
|             | 15                 | 0,20 <sup>bcd</sup> ± 0,01  | 1,03 <sup>m</sup> ± 0,05  | 0,37 <sup>cd</sup> ± 0,03   | 0,07 <sup>gh</sup> ± 0,00 |
| EXT F1      | 0                  | 0,06 <sup>ef</sup> ± 0,00   | 0,77 <sup>gh</sup> ± 0,07 | 0,12 <sup>fg</sup> ± 0,01   | <LQ                       |
|             | 1                  | 0,04 <sup>ef</sup> ± 0,02   | 0,59 <sup>k</sup> ± 0,01  | 0,11 <sup>fg</sup> ± 0,00   | 0,50 <sup>b</sup> ± 0,01  |
|             | 15                 | 0,06 <sup>ef</sup> ± 0,00   | 0,1 <sup>m</sup> ± 0,0    | 0,24 <sup>defg</sup> ± 0,01 | 0,06 <sup>h</sup> ± 0,00  |
| EXT F2      | 0                  | 0,06 <sup>ef</sup> ± 0,00   | 0,77 <sup>gh</sup> ± 0,07 | 0,12 <sup>fg</sup> ± 0,01   | <LQ                       |
|             | 1                  | 0,06 <sup>ef</sup> ± 0,00   | 0,75 <sup>h</sup> ± 0,05  | 0,11 <sup>fg</sup> ± 0,02   | <LQ                       |
|             | 15                 | 0,007 <sup>ef</sup> ± 0,40  | 0,51 <sup>l</sup> ± 0,00  | 0,15 <sup>efg</sup> ± 0,00  | 0,14 <sup>d</sup> ± 0,00  |
| COGAFT F1   | 0                  | 0,13 <sup>cde</sup> ± 0,01  | 1,15 <sup>e</sup> ± 0,00  | 0,25 <sup>cdef</sup> ± 0,00 | 0,07 <sup>gh</sup> ± 0,00 |
|             | 5                  | 0,30 <sup>b</sup> ± 0,04    | 1,74 <sup>b</sup> ± 0,00  | 0,52 <sup>b</sup> ± 0,00    | 0,11 <sup>e</sup> ± 0,01  |
| COGAFT F2   | 0                  | 0,14 <sup>cde</sup> ± 0,00  | 0,67 <sup>ji</sup> ± 0,02 | 0,24 <sup>defg</sup> ± 0,02 | 0,15 <sup>d</sup> ± 0,00  |
|             | 5                  | 0,13 <sup>cde</sup> ± 0,01  | 1,15 <sup>e</sup> ± 0,00  | 0,25 <sup>cdef</sup> ± 0,00 | 0,07 <sup>gh</sup> ± 0,00 |
| EXTAFT F1   | 0                  | 0,15 <sup>cde</sup> ± 0,02  | 1,23 <sup>d</sup> ± 0,07  | 0,29 <sup>cde</sup> ± 0,04  | 0,07 <sup>gh</sup> ± 0,01 |
|             | 5                  | 0,12 <sup>cdef</sup> ± 0,03 | 1,14 <sup>e</sup> ± 0,07  | 0,28 <sup>cde</sup> ± 0,02  | 0,07 <sup>gh</sup> ± 0,00 |
| EXTAFT F2   | 0                  | 0,07 <sup>ef</sup> ± 0,01   | 0,76 <sup>gh</sup> ± 0,00 | 0,15 <sup>efg</sup> ± 0,00  | 0,08 <sup>fg</sup> ± 0,01 |
|             | 5                  | 0,09 <sup>def</sup> ± 0,00  | 0,83 <sup>g</sup> ± 0,02  | 0,20 <sup>efg</sup> ± 0,01  | 0,07 <sup>gh</sup> ± 0,00 |

Nota 1: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; COGAFT F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; COGAFT F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; EXTAFT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação; EXTAFT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação.

Nota 2: valores expressos em média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Fischer LSD.

No extrato otimizado encontrou-se os ácidos glucurônico (0,59% ± 0,02), láctico (0,96% ± 0,03) e málico (2,72%) ± 0,14. O ácido glucurônico nas fermentações controle foi encontrado apenas no 15º dia na fermentação 1, não estando presente

nos outros dias dos controles. Já as fermentações adicionadas de cogumelo ou extrato apresentaram valores maiores deste ácido. As fermentações com maior quantidade de glucurônico detectadas foram as COG F1 e F2, tendo valores 3 vezes maiores que as fermentações EXT, 1,5 vezes maior que EXTAF1 e 1,3 vezes maior que COGAF1.

Em relação ao ácido málico, os valores iniciais na fermentação se mostram maiores que os valores ao 15º dia, isso se altera nas fermentações AFT, que hora sofrem um aumento no teor deste ácido (COGAF1 F1 e F2) ou tem valores sem diferença significativa ou com decréscimo mais lento como em EXTAF1 F1 e F2. O ácido málico, sob a ação de bactérias lácticas é convertido em ácido láctico e CO<sub>2</sub>. Essa descarboxilação acarreta uma diminuição da acidez e melhora na estabilidade e sabor da sidra (Alberti; Nogueira, 2021).

No caso das fermentações com adição, vê-se os valores aumentarem pois o cogumelo tem ácido málico em sua composição, porém, percebe-se a diminuição deste ácido ao longo da fermentação e o aumento do ácido láctico.

Ao observar os teores de ácido láctico nos controles, têm-se medidas entre 0,10% e 0,25%, sendo o comportamento crescente no controle F1 e estável em F2. Em COG F1 e F2 os valores são em média 3 vezes maiores que no controle (0,30%). EXT F1 e F2 exibem os valores mais próximos ao esperado. As fermentações AFT mantêm valores entre 0,15 e 0,52%. Os valores encontrados na literatura para o ácido láctico no mosto de maçã vão de 0 a 0,49% (Calugar, *et al.*, 2021; Wicklund, *et al.*, 2020).

O ácido láctico pode ser formado como produto final da glicólise, sendo a redução do ácido pirúvico, ou na transformação do ácido málico. Sensorialmente, ele é mais “suave” que o ácido málico, por isso sidras com maiores teores de ácido láctico são ditas mais equilibradas. Os teores finais são muito variados, principalmente em relação a presença ou não de fase malolática e aos microrganismos utilizados. Em Wicklund *et al.* (2020) foram encontrados valores entre 22 e 55 mg/L de ácido láctico; em Ye, Yue e Yuan (2014), o teor foi de 130,52 mg/L. Em Cerri *et al.* (2023), os teores de ácido láctico chegaram a 730 mg/L após 10 dias de fermentação apenas com *S. cerevisiae* e subiram para 850 mg/L quando fermentado junto com *Oenococcus oeni*.

Nos estudos apresentados, não havia teores iniciais de ácido láctico, porém conforme apresentado, valores iniciais de até 0,49% já foram relatados, ou seja, 4900

mg/L. No presente estudo, o mosto teve valor inicial de 1000 mg/L de ácido láctico e o maior resultado pós-adição foi de 5200 mg/L em COGAF1 F1.

Um comportamento observado no ácido acético na maioria das fermentações é o de um aumento considerável nas primeiras 24h de fermentação, porém com uma diminuição também considerável até o 15º dia. Os valores finais de ácido acético variaram entre 0,04 (400 mg/L) e 0,14% (1400 mg/L) nas diferentes fermentações.

Em Wicklund *et al.*, (2020), os teores de ácido acético encontrados nas sidras variam entre 89 e 208 mg/L. Zuriarrain *et al.* (2015) encontrou valores entre 330 mg/L e 2560 mg/L em sidras comerciais na Espanha.

### 3.3.3.7 Resultados da composição aromática dos fermentados

Foram avaliados a presença e concentração dos 9 padrões aromáticos: propil-acetato, 2-hexanona, 3-metil-1-butanol, butirato de etila, 1-pentanol, hexil-acetato, 2-heptanona, 1-octen-3-ol e isopentil acetato. Destes, apenas 2 foram encontrados nas amostras: butirato de etila e 3-metil-1-butanol, demonstrados na Tabela 16.

O butirato ou butanoato de etila é um éster de aroma frutado, descrito como semelhante ao morango, abacaxi, banana e maçã. Sua formação acontece a partir do ácido butírico. Os controles apresentaram em média os maiores níveis de butirato de etila. As fermentações COG e EXT apresentaram níveis maiores de butirato de etila que as fermentações COGAF1 e EX1AF1, que tiveram os menores níveis detectados.

No estudo de Xu *et al.* (2019) foram encontrados de 36,4 a 64,3 µg/L de butirato de etila. Este valor é pelo menos 80 vezes maior do que o encontrado no presente estudo. Já no estudo de (Guo; Yue; Yuan, 2018), o valor total de butirato de etila foi de 1751 µg/L. Ambos os estudos utilizaram headspace com SPME (solid phase micro-extraction, um dispositivo de microextração em fase sólida). Em Yu *et al.* (2022), o valor para butirato de etila ficou entre 0,2 e 12,8 µg/L, dependendo do tratamento. O butirato de etila tem valor de threshold de 20 µg/L (Wei *et al.*, 2020).

Tabela 16. Quantificação de compostos aromáticos das diferentes formulações de sidra

| Amostra     | Dia | Butirato de etila (µg/L)  | 3-metil-1-butanol (µg/L)   |
|-------------|-----|---------------------------|----------------------------|
| EXT OTM     | -   | <LQ                       | <LQ                        |
| Controle F1 | 0   | <LD                       | <LD                        |
|             | 1   | <LD                       | <LD                        |
|             | 15  | 0,35 <sup>d</sup> ± 0,22  | 8,00 <sup>de</sup> ± 2,00  |
| Controle F2 | 0   | <LD                       | <LD                        |
|             | 1   | <LD                       | <LD                        |
|             | 15  | 0,51 <sup>c</sup> ± 0,12  | 10,00 <sup>cd</sup> ± 0,00 |
| COG F1      | 0   | <LD                       | <LD                        |
|             | 1   | <LD                       | <LD                        |
|             | 15  | 0,18 <sup>e</sup> ± 0,00  | 14,00 <sup>b</sup> ± 1,00  |
| COG F2      | 0   | <LD                       | <LD                        |
|             | 1   | <LD                       | 1,00 <sup>fg</sup> ± 0,00  |
|             | 15  | 0,38 <sup>cd</sup> ± 0,15 | 10,00 <sup>cd</sup> ± 2,00 |
| EXT F1      | 0   | <LD                       | <LD                        |
|             | 1   | <LD                       | <LD                        |
|             | 15  | 0,45 <sup>cd</sup> ± 0,00 | 6,00 <sup>e</sup> ± 2,00   |
| EXT F2      | 0   | <LD                       | <LD                        |
|             | 1   | <LD                       | 1,00 <sup>fg</sup> ± 1,00  |
|             | 15  | 0,1 <sup>ef</sup> ± 0,0   | 6,00 <sup>e</sup> ± 2,00   |
| COGAFT F1   | 0   | 0,4 <sup>cd</sup> ± 0,0   | 8,00 <sup>de</sup> ± 1,00  |
|             | 5   | 0,5 <sup>c</sup> ± 0,0    | 11,00 <sup>c</sup> ± 1,00  |
| COGAFT F2   | 0   | 1,2 <sup>a</sup> ± 0,2    | 21,00 <sup>a</sup> ± 2,00  |
|             | 5   | 0,5 <sup>c</sup> ± 0,2    | 8,00 <sup>de</sup> ± 1,0   |
| EXTAFT F1   | 0   | 0,4 <sup>cd</sup> ± 0,0   | 10,00 <sup>cd</sup> ± 1,00 |
|             | 5   | 0,4 <sup>cd</sup> ± 0,2   | 12,00 <sup>bc</sup> ± 2,00 |
| EXTAFT F2   | 0   | 0,5 <sup>c</sup> ± 0,2    | 8,00 <sup>de</sup> ± 1,00  |
|             | 5   | 0,7 <sup>b</sup> ± 0,0    | 7,00 <sup>f</sup> ± 0,00   |

Nota 1: COG F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo; COG F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo. EXT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado; EXT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado; COGAFT F1: primeira fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; COGAFT F2: segunda fermentação adicionada de cogumelo no dia 12 da fermentação; EXTAFT F1: primeira fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação; EXTAFT F2: segunda fermentação adicionada de extrato otimizado no dia 12 da fermentação.

Nota 2: valores expressos em média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Fischer LSD.

O etil butirato, juntamente com o acetato de etila, o álcool butílico e o álcool 2-metilpropílico são os mais facilmente perdidos durante o processo de esmagamento da fruta (Arvisenet *et al.*, 2006). Os polifenóis também podem influenciar na volatilidade de alguns compostos como butirato de etila, octanoato de etila, 4-etilfenol, 1-hexanol, 2-fenil etanol. Isso está relacionado à conformação espacial dos polifenóis e sua concentração. A volatilidade destes compostos mais hidrofóbicos pode diminuir, aumentando a permanência destes compostos na sidra quando o teor de epicatequina, ácido hidrocafeico e floridizina estão presentes (Guo; Yue; Yuan, 2018). Neste presente estudo, o teor de ácido clorogênico foi considerado alto, porém não foram encontrados epicatequina, ácido cafeico e floridizina, isso pode ter colaborado para os teores reduzidos de butirato de etila.

O maior valor de 3-metil-1-butanol, que é um álcool superior descrito com um aroma de mel e frutado, foi encontrado em COGAF2 F2, no dia da adição do cogumelo, porém, este aroma presente no dia 0 não foi mantido até o final da fermentação. Yu *et al.* (2022) quantificou entre 600 e 1200 µg/L de 3-metil-1-butanol nas sidras analisadas. Em Guo, Yue e Yuan (2018) foram encontrados 32,36 mg/L do 3-metil-1-butanol. O threshold deste composto é de 30.000 µg/L.

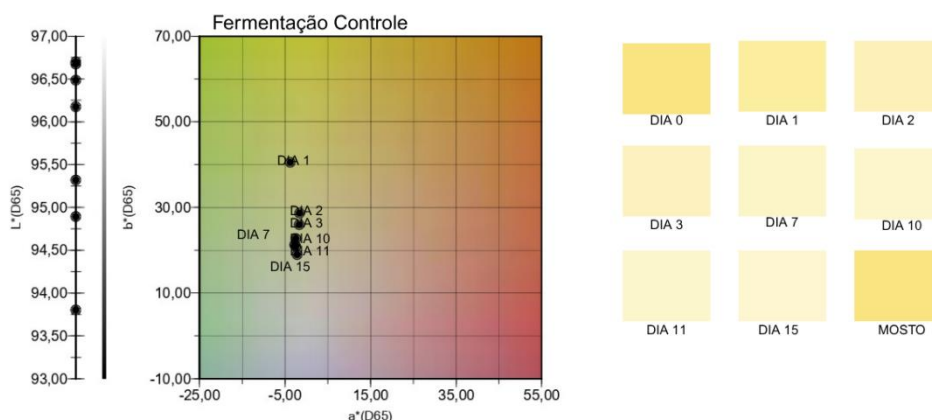
Os dados obtidos não são suficientes para definir a diferença entre os tratamentos em relação ao aroma da fermentação. É necessário uma caracterização mais profunda das amostras, com utilização de detector de massas (CG-LC-MS), para uma comparação mais precisa.

#### 3.3.3.8 *Análise de cor*

A amostra controle e com adição de cogumelo e extrato foram comparadas durante os dias amostrais em relação à luminosidade  $L^*$ , cor verde/vermelho  $a^*$ , e cor azul/amarelo  $b^*$ . Desta representação numérica, chamada CIE Lab\* foram desenvolvidos gráficos de cor demonstrando a evolução de cor da bebida durante a fermentação e comparando as fermentações em seus dias finais.

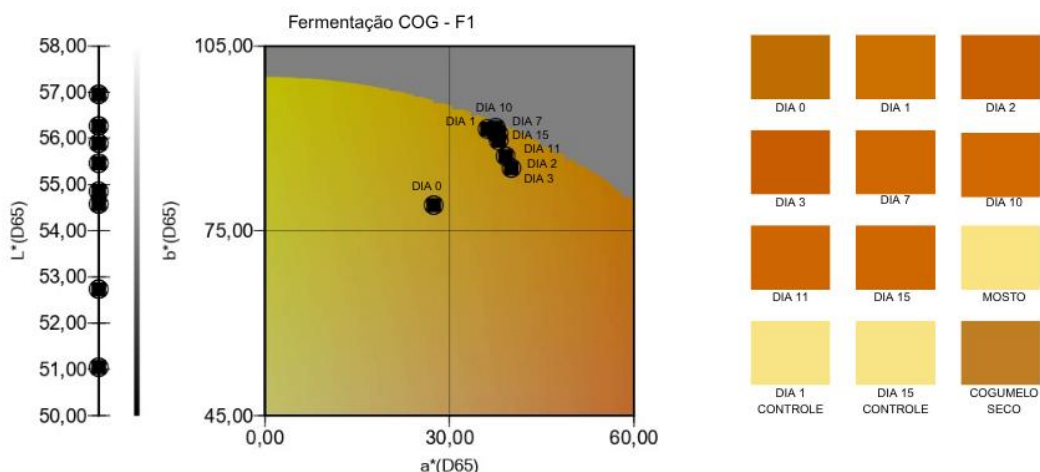
Na Figura 15, estão representadas as médias das cores obtidas nos 15 dias de fermentação controle. Observa-se que o mosto tende a uma cor mais amarelada, que ganha uma tonalidade “areia” ou “palha”, típica da sidra.

Figura 15. Evolução das cores da sidra controle durante os 15 dias de fermentação.



Na Figura 16 estão apresentadas as cores das fermentações COG. Nesta fermentação observa-se a prevalência de um tom ainda na região do amarelo, porém com maior presença de subtons entre o vermelho e o marrom, influenciado pela extração dos compostos do cogumelo durante os dias da fermentação. Esta cor no cogumelo é dada em parte pelos carotenoides, que estão presentes em quantidades de 2000 a 7000 ug/g (Yang *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021) Ainda observando a Figura 16, pode-se observar a diferença entre as cores da fermentação COG com o mosto e os dias 1 e 15 do controle.

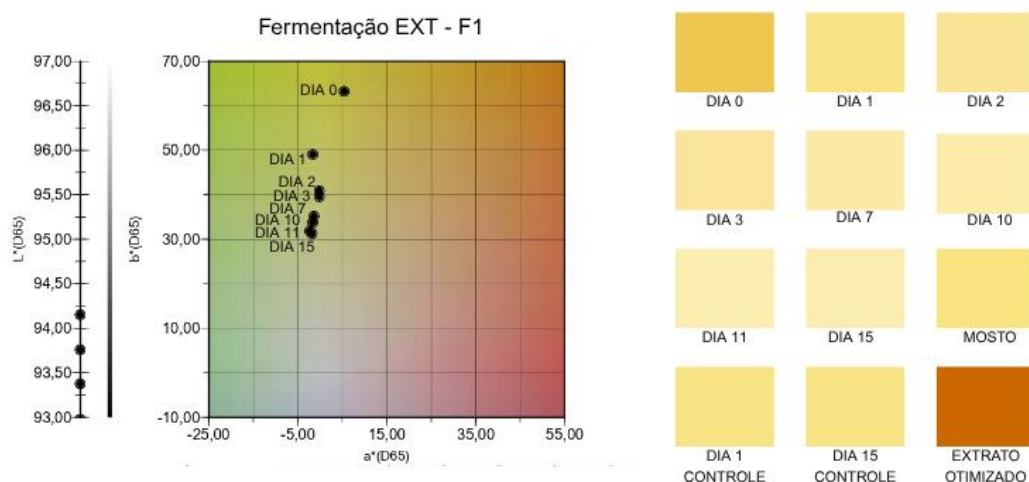
Figura 16. Evolução das cores da sidra COG durante os 15 dias de fermentação.



Na Figura 17 foram compilados os resultados para cor das fermentações EXT F1 e F2. Em relação a cor, esta fermentação encontra-se mais próxima ao esperado para a sidra, como pode se observar comparando com o mosto e os dias 1 e 15 do controle. Apesar do extrato ter uma cor mais intensa e voltada quase para um marrom

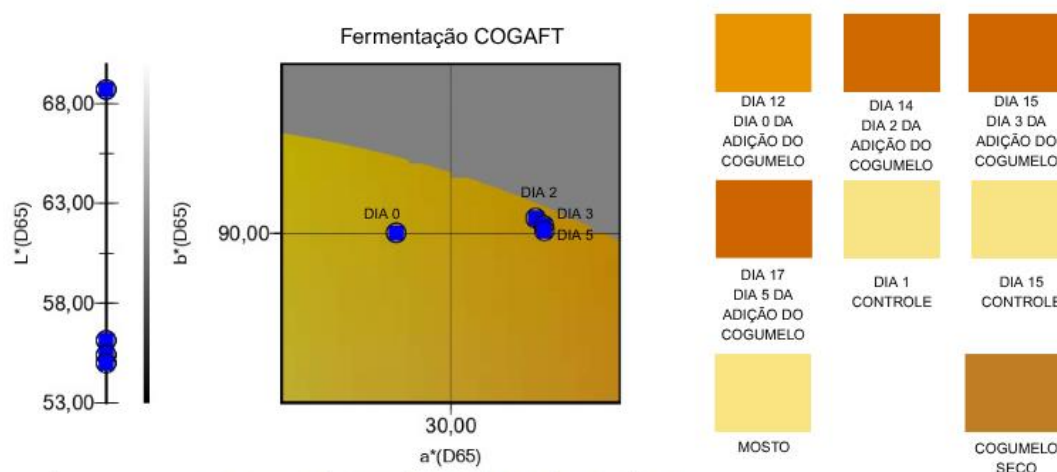
alaranjado, a quantidade inserida na fermentação (20 mL) alterou a cor final, porém mantendo-a mais próxima que as outras fermentações.

Figura 17. Evolução das cores da sidra EXT durante os 15 dias de fermentação.



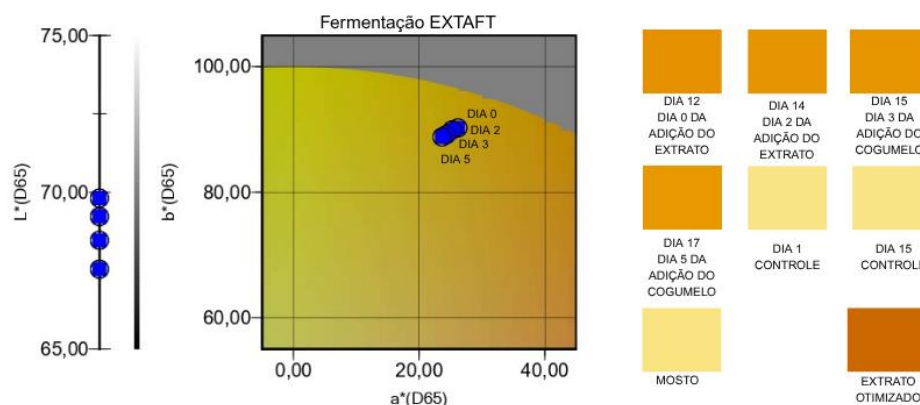
Na Figura 18, estão os dados relacionados a fermentação COGAFT. Nesta imagem é possível observar o quanto a adição do cogumelo afasta a fermentação do tom amarelo em direção ao vermelho, a medição do dia 0 foi realizada 20 minutos após a inserção do cogumelo e já é possível observar uma grande diferença na intensidade do amarelo entre o dia 15 do controle e o dia 0 da adição do cogumelo. Porém observando do dia 2 em diante, podemos ver que a cor se afasta um pouco mais do amarelo em direção ao vermelho e alcança uma estabilidade aparente.

Figura 18. Evolução das cores da sidra COGAFT durante os 5 dias de fermentação.



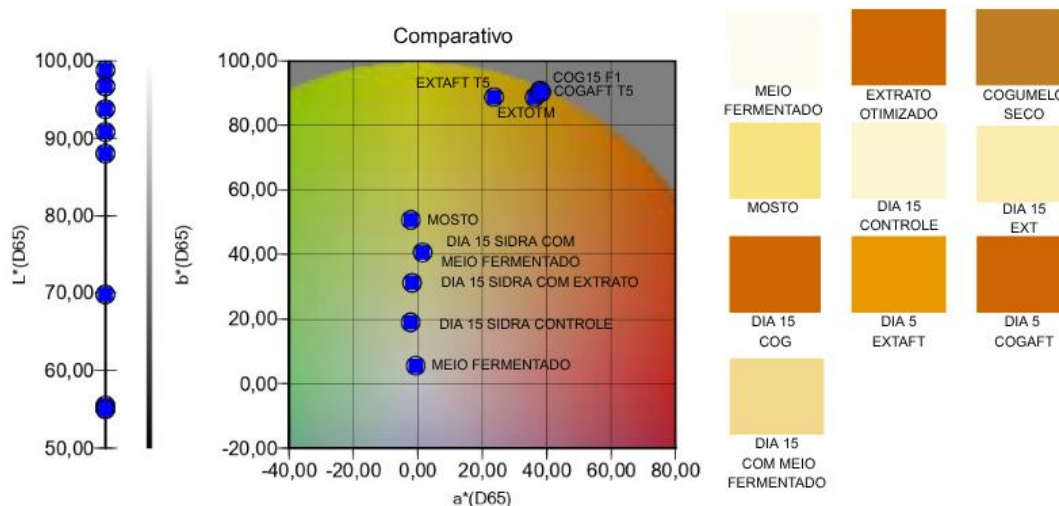
Em relação a fermentação adicionada de extrato no 12º dia (EXTAFT), pode-se verificar (Figura 19) que o extrato exerceu maior influência na cor ao ser adicionado nesta fase do que ao início do processo (como em EXT).

Figura 19. Evolução das cores da sidra EXTAFT durante os 5 dias de fermentação.



Na Figura 20, está apresentado o comparativo do último dia de cada fermentação.

Figura 20. Comparativo das cores das diferentes formulações de sidra nos últimos dias de cada fermentação.

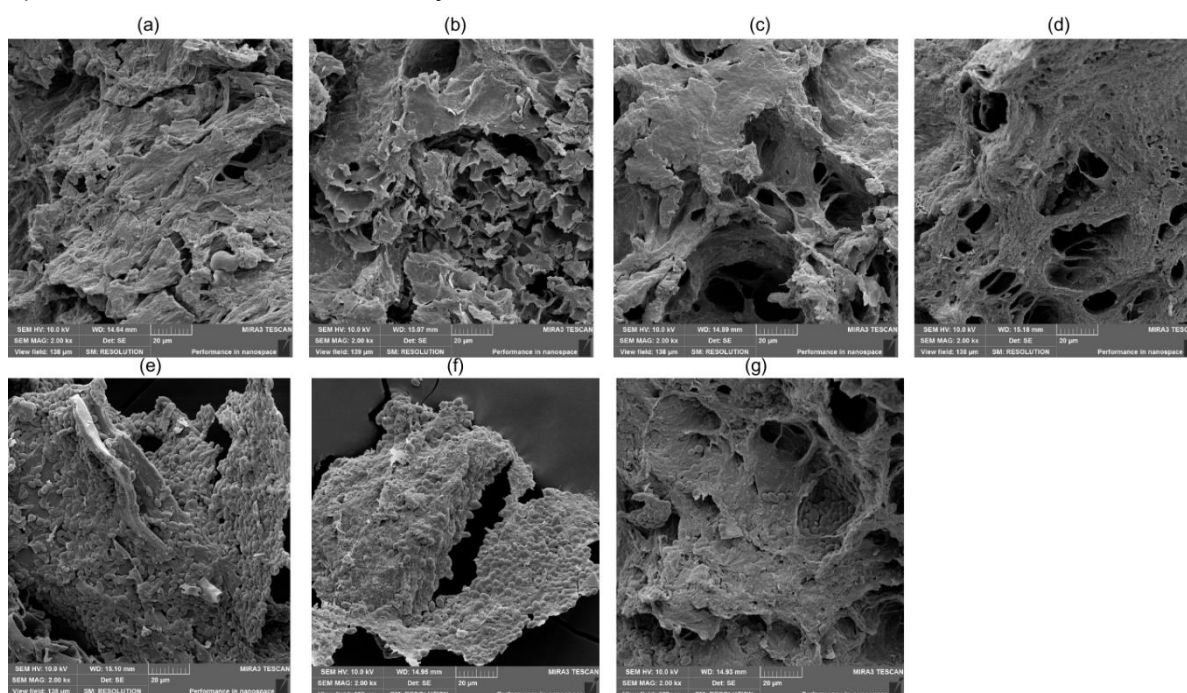


### 3.3.3.9 Imagens em microscópio eletrônico de varredura

Na Figura 21, encontram-se as imagens dos dias 1, 2, 3, 7, 10, 1 e 15 da fermentação COG. Nos dias 1 a 3, não se evidenciou a presença das leveduras na matriz fúngica, porém, a partir do dia 7, já é possível perceber algumas leveduras

utilizando o pó do cogumelo como suporte para crescimento. Nas imagens dos dias 10, 11 e 15, observa-se a máxima colonização, com toda a superfície coberta de leveduras. Isto prova principalmente a aptidão desse cogumelo na utilização em conjunto com as *Saccharomyces cerevisiae*, mas demonstra também que as leveduras utilizaram este cogumelo como um suporte para seu crescimento, parecido com o que acontece na utilização de materiais para imobilização de leveduras em fermentações.

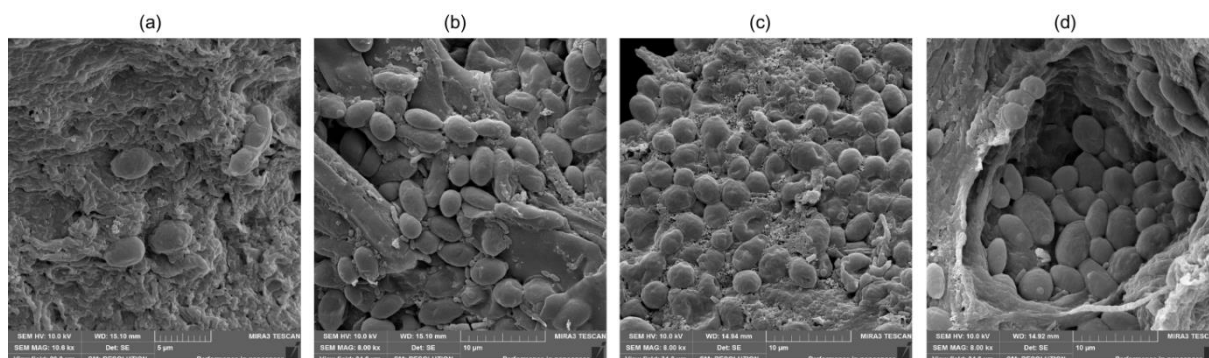
Figura 21. Evolução da estrutura e da presença de leveduras nos resíduos do cogumelo cominuído após os dias amostrais da fermentação COG.



Nota: (a) corresponde ao resíduo de cogumelo retirado após o 1º dia de fermentação, (b) após o 2º, (c) após o 3º, (d) após o 7º, (e) após o 10º, (f) após o 11º e (g) após o 15º dia de fermentação, todos com aumento de 8000.

A Figura 22, mostra em mais detalhe os resíduos de cogumelo retirados nos dias 7, 10, 11 e 15, e é possível observar a colonização desta matriz pelas leveduras.

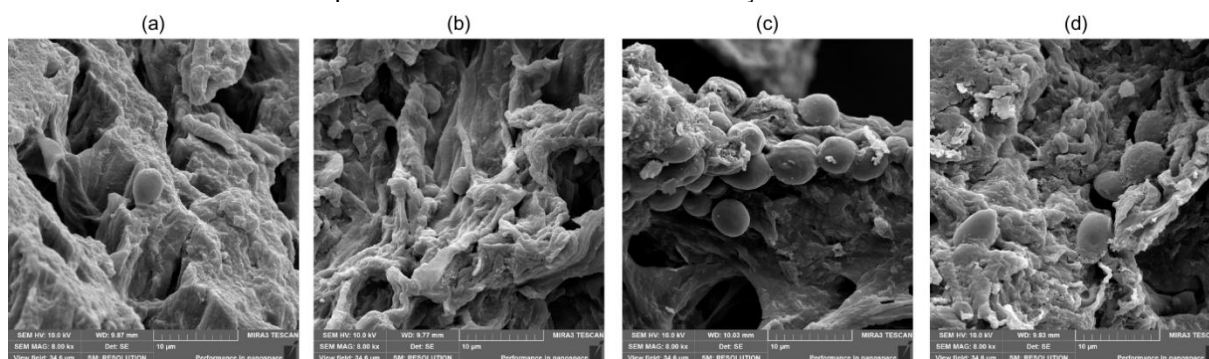
Figura 22. Detalhes em FEG das leveduras encontradas no resíduo de cogumelo nas fermentações COG



Nota: aumento de 8000 vezes nas amostras de resíduo dos dias 7(a), 10 (b), 11(c) e 15(d) da fermentação COG.

Na Figura 23, observam-se os dias 0, 2, 3 e 5 da fermentação COGAFT. No dia 0 e 2 temos poucas incidências de leveduras, o que é esperado, afinal no dia 0 o cogumelo foi inserido e retirado após 20 minutos e no dia 2, 48h após o início da fermentação. Apesar de, diferentemente do dia 0 da fermentação COG, já existir uma população considerável de leveduras no dia 0 da fermentação COGAFT, ainda assim, é necessário que as leveduras tenham um tempo para colonizar a matriz fúngica. Nas fotos dos dias 3 (c) e 5 (d), já se nota mais facilmente um conjunto de leveduras utilizando o pó do cogumelo como suporte para o crescimento.

Figura 23. Evolução da estrutura e da presença de leveduras nos resíduos do cogumelo cominuído após os dias amostrais da fermentação COGAFT.



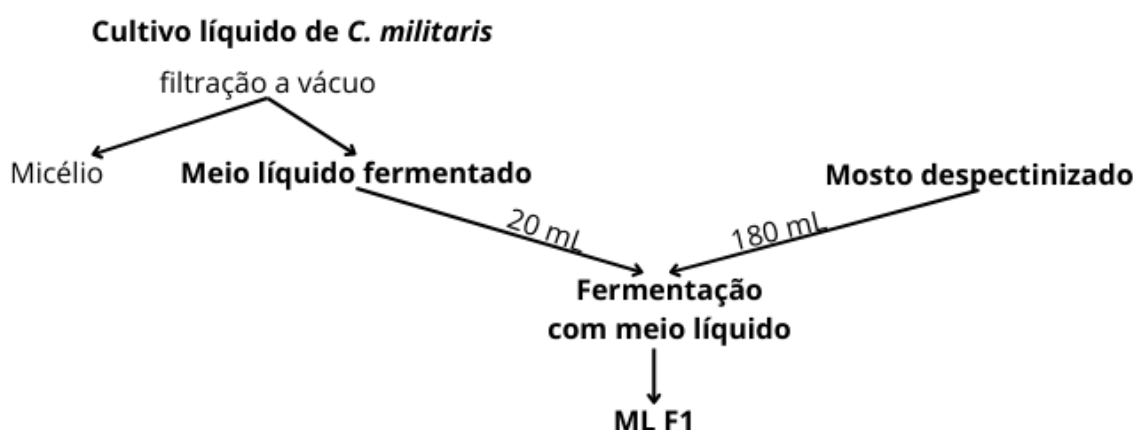
Nota: aumento de 8000 vezes nas amostras de resíduo dos dias 0(a), 2 (b), 3(c) e 5(d) da fermentação COGAFT.

### 3.3.4 Resultados da Fermentação com Adição de Meio Líquido Fermentado

Conforme relatado ao longo desta tese, a fermentação adicionada de meio líquido não teve a performance esperada, comparada ao controle, tendo possivelmente sofrido de algum composto que inibiu a fermentação das leveduras. Por este motivo, os resultados obtidos nas análises subsequentes foram separados

do capítulo III e adicionados ao apêndice, porém as análises foram realizadas da mesma forma descritas na metodologia.

O meio líquido fermentado consiste no líquido onde ocorreu o crescimento do fungo, diferentemente do crescimento em meio sólido que forma o micélio e posteriormente o cogumelo, no líquido o crescimento micelial pode acontecer de forma dispersa quando em cultivo submerso, ou formando um disco de micélio se for de cultivo em superfície. Neste trabalho realizou-se o cultivo de superfície, o micélio foi separado do meio líquido, que recebeu os tratamentos relatados no segundo capítulo para poder ser aplicado na sidra.



Abaixo estão apresentados os resultados obtidos com a sidra adicionada de meio líquido fermentado.

Tabela 17. Progressão do pH na sidra adicionada de meio líquido fermentado

| TEMPO (h) | pH   | Células/mL |
|-----------|------|------------|
| 0         | 4,06 | 6,38E+05   |
| 24        | 3,88 | 1,81E+06   |
| 48        | 4,03 | 1,70E+07   |
| 72        | 3,98 | 1,58E+07   |
| 170       | 3,9  | 5,56E+06   |
| 240       | 3,86 | 2,05E+06   |
| 264       | 3,98 | 2,38E+06   |
| 360       | 4,01 | 1,21E+07   |

Entre as 24 e 48h da fermentação, a sidra adicionada de meio líquido mudou radicalmente de cor, como mostrado nas imagens abaixo. Levantou-se a hipótese de ser uma atividade enzimática, portanto, estabeleceu-se o teste utilizando o meio líquido pasteurizado. Para a pasteurização, o meio líquido foi mantido a 80 °C por 15 minutos. Na fermentação com o pasteurizado não houve mudança de cor. Não foram realizadas mais análises para avaliar a composição enzimática do meio líquido. A fermentação, no entanto, teve o mesmo perfil da fermentação com o meio líquido não-pasteurizado, ou seja, pouca liberação de gás carbônico comparada à fermentação padrão.

Figura 24. Foto comparativa da cor dos fermentados no tempo 0 da fermentação.

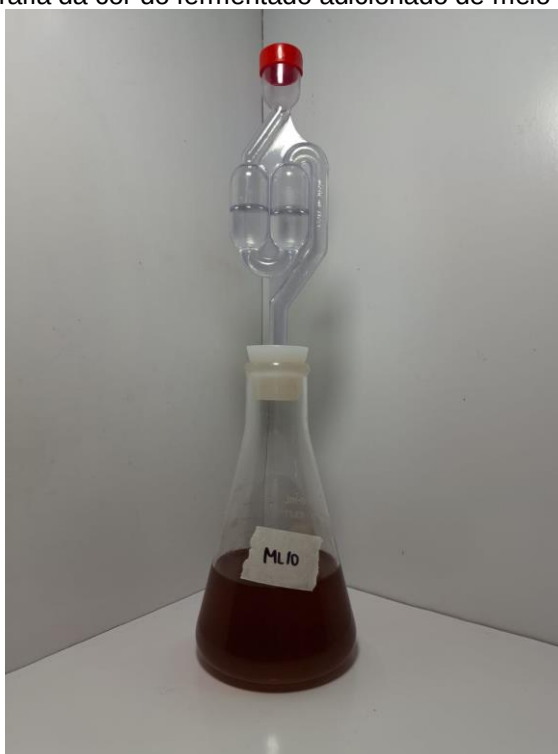


Fonte: a autora

Figura 25. Fotografia do fermentado adicionado de meio líquido no dia 0.



Figura 26. Fotografia da cor do fermentado adicionado de meio líquido ao 10º dia.



### 3.4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição do cogumelo *C. militaris* foi compatível com a utilização da *S. cerevisiae*, demonstrado principalmente pelas imagens de microscópio eletrônico de varredura onde as leveduras foram encontradas dentro das microestruturas do cogumelo cominuído, mas também pelos parâmetros fermentativos, como o crescimento celular e a produção de CO<sub>2</sub> que foram eficientes tanto nas fermentações adicionadas de cogumelo quanto nas adicionadas de extrato.

As diferenças então podem ser encontradas entre as adições, dependendo do que se deseja favorecer. Ao adicionar o cogumelo no tempo 0 da fermentação (em comparação ao controle), foi observado um aumento da velocidade e da produção de CO<sub>2</sub>, aumento do teor de compostos fenólicos totais e do ácido clorogênico (particularmente), aumento do percentual de ácidos orgânicos, principalmente pelo aumento dos ácidos málico e láctico, porém com teor semelhante ao controle de açúcares residuais e etanol, teor diminuído dos aromas analisados e classificação de leve toxicidade.

Já na fermentação adicionada de extrato no dia 0 (EXT), observa-se uma produção menor de CO<sub>2</sub>, e com menor velocidade, comparado ao controle e a fermentação COG; menor residual de ácidos orgânicos que a fermentação COG, porém mais próximo ao padrão; percentual de açúcar residual similar ao controle, porém com teor alcóolico mais elevado. A produção dos aromas estudados foi em média mais baixa que o controle. Em relação aos compostos fenólicos teve valores mais próximos ao controle e menores que a fermentação COG, também observado no teor de ácido clorogênico. Porém, com estes resultados, foi considerado atóxico pelo ensaio com *Artemia salina*.

Em relação as fermentações AFT, ou seja, as fermentações adicionadas de extrato e cogumelo no 12º dia de fermentação, ambas foram capazes de prolongar a fermentação, pois no controle há um início de comportamento de morte celular, enquanto nas fermentações AFT vê-se uma continuidade da fermentação.

A adição do cogumelo no 12º dia da fermentação (COGAFT) teve produção aumentada de compostos fenólicos totais, porém sem grandes diferenças na produção de ácido clorogênico. Nesta fermentação está a maior concentração de ácidos orgânicos, muito pela adição do ácido málico trazida pelo cogumelo e que não foi convertido em ácido láctico. Isso pode acarretar maior acidez e adstringência para

a sidra, visto que o ácido láctico é mais desejado sensorialmente. Esta foi também a fermentação com maior percentual médio de açúcar residual (1% em média) e teor de etanol mais alto que o controle e o COG, porém ainda dentro do permitido pela legislação. Nesta fermentação foram encontrados os maiores valores para os aromas estudados, porém foram encontrados no dia 0 e não foram mantidos até o dia 5. Esta fermentação também foi considerada atóxica.

Por fim, a fermentação adicionada de extrato otimizado no 12º dia da fermentação (EXTAFT), apresentou teor de compostos fenólicos totais maior que o controle e a fermentação EXT, porém com valores menores que COG e COGAFT. Teve valores finais de ácido orgânicos mais elevados que o controle, porém parecidos com as fermentações adicionadas. Assim como COGAFT, teve valores maiores de ácido málico que não foram convertidos em ácido láctico, podendo causar uma acidez indesejada. Apesar disso, assim como em COGAFT também, o teor de açúcares residuais também foi maior que no controle. Este açúcar residual pode auxiliar a equilibrar o excesso de acidez. Em relação aos aromas, esta fermentação teve baixa produção dos compostos avaliados. Esta fermentação também foi considerada atóxica.

Houve diferença na cor de todas as fermentações adicionadas. Para entender se essas mudanças são bem recebidas pelos consumidores é necessário realizar uma análise sensorial em estudos futuros.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração dos compostos fenólicos pôde ser otimizada e o modelo validado. Destaca-se a inovação e precursão deste trabalho em estudar a adição do cogumelo *C. militaris* para desenvolvimento de um fermentado de maçã. Houve progresso na determinação de melhores parâmetros para extração de compostos fenólicos e antioxidantes do cogumelo, utilizando solventes verdes e tempos diminutos na extração, o que colabora para um desenvolvimento sustentável.

Houve um avanço na área a partir do conhecimento da possibilidade de utilização deste cogumelo junto com a levedura *Saccharomyces cerevisae*. A utilização do cogumelo, tanto em extrato quanto em pó, permitiu a adição de compostos fenólicos. O ácido láctico, desejável para melhor sensorial do produto também foi encontrado em maior quantidade nas fermentações adicionadas, porém, a maior presença do ácido málico pode ser um desafio sensorial.

Pela primeira vez também foi registrado a utilização do cogumelo cominuído como suporte para o crescimento das leveduras. Este estudo contribui para o desenvolvimento de bebidas adicionadas de cogumelo, que tem potencial para se tornar uma inovação neste mercado.

## REFERÊNCIAS

- AICV. European Cider and Fruit Wine Association. 2019. **European Cider Trends 2019**. Acesso em 23 de junho de 2021. <https://aicv.org/en/publications>
- AICV. European Cider and Fruit Wine Association. 2020. **European Cider Trends 2023**. Acesso em 19 de junho de 2024. <https://aicv.org/en/publications>
- AICV. European Cider and Fruit Wine Association. 2020. **European Cider Trends 2024**. Acesso em 11 de março de 2025. <https://aicv.org/en/publications>
- ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Cider. In: CASTILHOS, M. B. M.; BIANCHI, V. L. B.; MANFROI, V. (Org.). **Fermented and Distilled Alcoholic Beverages: A Technological, Chemical and Sensory Overview**. Fermented Beverages. 1ed. New York: Nova Science Publishers, 2021, v. 1, p. 100-132
- ALBERTI, A.; SANTOS; ZIELINSKI, A. A. F.; dos SANTOS, C. M. E.; BRAGA, C. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A. Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. **LWT**, v. 65, p. 436–443, 2015.
- ALBERTI, A.; VIEIRA, R. G.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.54, p. 551-558, 2011.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ZARDO, D. M.; DEMIATE, I. M.; NOGUEIRA, A.; MAFRA, L. I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 149, p. 151–158, 2014.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; BORTOLINI, D. G.; BENVENUTTI, L.; SILVA, E. T. Da; DUCATTI, C.; NOGUEIRA, A. Desvendando a composição da sidra brasileira por isótopos estáveis e análises físico-químicas. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 7, n. 3, p. 133–149, 2016.
- ANVISA. **Resolução nº 16, de 30 de abril de 1999**. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes. Brasília, DF, 30 abr. 1999.
- ARAMWIT, P.; PORASUPHATANA, S.; SRICHANA, T.; NAKPHENG, T. Toxicity evaluation of cordycepin and its delivery system for sustained in vitro anti-lung cancer activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1186/s11671-015-0851-1.
- ARVISENET, G.; BILLY, L.; ROYER, G.; PROST, C. Role of mastication on the release of apple volatile compounds in a model mouth system. **Developments in Food Science**, p. 465–468, 2006.
- ASSEMIE, A.; ABAYA, G. The Effect of Edible Mushroom on Health and Their Biochemistry. **International Journal of Microbiology**, v. 2022, p. 1–7, 23 mar. 2022.

BAI, K. C.; SHEU, F. A novel protein from edible fungi *Cordyceps militaris* that induces apoptosis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 21–30, 2018. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.10.013.

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

BELY, M; SABLAYROLLES, J-M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **Am. J. Enol. Viticult.**, 41, 319–324, 1990.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. T. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 239, p. 70–76, 1996.

BENVENUTTI, L.; BORTOLINI, D. G.; NOGUEIRA, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A. Effect of addition of phenolic compounds recovered from apple pomace on cider quality. **LWT**, v. 100, p. 348–354, 2019. Elsevier BV.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1º ed., Curitiba, Appris, 2015.

BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, 2, 455-475, 1960.

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

CALUGAR, P. C.; COLDEA, T. E.; SALANȚĂ, L. C.; et al. An Overview of the Factors Influencing Apple Cider Sensory and Microbial Quality from Raw Materials to Emerging Processing Technologies. **Processes**, v. 9, n. 3, p. 502–502, 2021.

CARRARO, M. M.; SOLA, I. M. M. S.; SANTOS, R. D. M.; DEMIATE, I. M.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Impact of Heat Treatment on Hard Cider Enriched with Cryo-Concentrated Apple Must: Microbiological Profile, Functional Properties, and Storage Stability. **Fermentation**, v. 11, n. 4, p. 188–188, 2025. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

CERRI, M. L.; GOMES, T. A.; CARRARO, M. DE M.; et al. Assessing the Impact of Simultaneous Co-Fermentation on Malolactic Bioconversion and the Quality of Cider Made with Low-Acidity Apples. **Fermentation**, v. 9, n. 12, p. 1017, 2023.

CIRLINCIONE, F.; PIRRONE, A.; GUGINO, I. M.; TODARO, A.; NASELLI, V.; FRANCESCA, N.; ALFONZO, A.; MIRABILE, G.; FERRARO, V.; BALENZANO, G.; GARGANO, M. L. Technological and Organoleptic Parameters of Craft Beer Fortified with Powder of the Culinary–Medicinal Mushroom *Pleurotus eryngii*. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 10, p. 1000, 9 out. 2023.

CHAUHAN, D.; SHARMA, S. P. Biochemical Analysis of Fruiting Bodies of *Cordyceps militaris* grown on brown rice. **Journal of advances in Microbiology**, v. 24, n. 11, p. 62 – 69, 2024.

CHEN, Lin; LIU, Yuetao; GUO, Qingfeng; ZHENG, Qingxia; ZHANG, Wancun. Metabolomic comparison between wild *Ophiocordyceps sinensis* and artificial cultured *Cordyceps militaris*. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 9, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1002/bmc.4279.

CHONG, Y.-K.; KAR-LIN NYAM. Effect of brewing time and temperature on the physical properties, antioxidant activities and sensory of the kenaf leaves tea. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 510–517, 26 fev. 2021.

COLDEA, T. E.; SOCACIU, C.; MUDURA, E.; et al. Volatile and phenolic profiles of traditional Romanian apple brandy after rapid ageing with different wood chips. **Food Chemistry**, v. 320, p. 126643, 2020.

DA SILVA, K. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; BENVENUTTI, L.; BORTOLINI, D. G.; ZARDO, D. M.; BELTRAME, F. L.; NOGUEIRA, A.; ALBERTI, A. Effect of fruit ripening on bioactive compounds and antioxidant capacity of apple beverages. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 294–300, 2019. DOI: 10.1590/fst.25317

DAI, Y.; ZHOU, J.; WANG, L.; DONG, M.; XIA, X. Biotransformation of soy whey into a novel functional beverage by *Cordyceps militaris* SN-18. **Food Production Processing and Nutrition**, v. 3, n. 1, 3 abr. 2021.

EIAMTHAWORN, K.; KAEWKOD, T.; BOVONSOMBUT, S.; TRAGOOLPUA, Y. Efficacy of *Cordyceps militaris* Extracts against Some Skin Pathogenic Bacteria and Antioxidant Activity. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 4, p. 327–327, 22 mar. 2022.

GIRARDI-PIVA, G.; CASALTA, E.; LEGRAS, J.-L.; et al. Influence of ergosterol and phytosterols on wine alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. Frontiers Media SA.

GRANATO, D.; NUNES, D. S. **Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de Alimentos e Bebidas. Uma abordagem Teórico-Prática**. Elsevier, 2016.

GUINÉ, R. P. F.; BARROCA, M. J.; COLDEA, T. E.; BARTKIENE, E.; ANJOS, O. Apple Fermented Products: An Overview of Technology, Properties and Health Effects. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 223–223, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

GUO, J.; YUE, T.; YUAN, Y. Impact of polyphenols on the headspace concentration of aroma compounds in apple cider. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1635–1642, 2018.

FU, F.; CHEN, L.; CAO, Q. Separation and Determination of Cordycepin and Adenosine in Artificial *Cordyceps Sinensis* Mycelium by Gradient UPLC. **IOP**

**Conference Series Materials Science and Engineering**, v. 394, p. 022019–022019, 2018.

HIRST, M. B.; RICHTER, C. L. Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 67, n. 4, p. 361–370, 2016.

HSU, T.-H.; SHIAO, L.-H.; HSIEH, C.; CHANG, D.-M. A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 463–469, 1 set. 2002.

HU, S.; WANG, J.; LI, F.; HOU, P.; YIN, J.; YANG, Z.; YANG, X.; LI, T.; XIA, B.; ZHOU, G.; LIU, M.; SONG, W.; GUO, S. Structural characterisation and cholesterol efflux improving capacity of the novel polysaccharides from *Cordyceps militaris*. **International journal of biological macromolecules**, v. 131, p. 264–272, 2019. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.078

HUANG, S.-J.; TSAI, S.-Y.; LEE, Y.-L.; MAU, J.-L. Nonvolatile taste components of fruit bodies and mycelia of *Cordyceps militaris*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 6, p. 577–583, ago. 2006.

HUR, H. Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*. **Mycobiology**, v. 36, n. 4, p. 233, 2010. DOI: 10.4489/myco.2008.36.4.233.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4<sup>a</sup> ed. [1<sup>a</sup> ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [[http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7](http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7)].

JĘDREJKO, K. J.; LAZUR, J.; MUSZYŃSKA, B. *Cordyceps militaris*: An Overview of Its Chemical Constituents in Relation to Biological Activity. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2634, 30 out. 2021.

JIANG, J.; TIAN, J.; LI, W.; YU, G. Analysis of volatile components in beer containing *Cordyceps militaris* extract by electronic nose and GC-MS. **ScienceAsia**, v. 46, n. 3, p. 323, 2020.

JUNG, S. J.; JUNG, E. S.; CHOI, E. K.; SIN, H. S.; HA, K. C.; CHAE, S. W. Immunomodulatory effects of a mycelium extract of *Cordyceps (Paecilomyces hepiali*; CBG-CS-2): A randomized and double-blind clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2019. a. DOI: 10.1186/S12906-019-2483-Y/TABLES/3

KREIPKE, V. C.; MOFFATT, R. J.; TANNER, C. J.; ORMSBEE, M. J. Effects of Concurrent Training and a Multi-Ingredient Performance Supplement Containing *Rhodiola rosea* and *Cordyceps sinensis* on Body Composition, Performance, and Health in Active Men. **Journal of Dietary Supplements**, v. 18, n. 6, p. 597–613, 2021. DOI: 10.1080/19390211.2020.1822486.

KIM, J. S.; SAPKOTA, K.; PARK, S-E.; CHOI, B-S.; KIM, S.; NGUYEN, T. H.; KIM, C-S.; CHOI, H-S.; KIM, M-K.; CHUN, H-S.; PARK, Y.; KIM, S-J. A fibrinolytic enzyme from the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Journal of Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 622–631, 2006.

KRÜGER, R. T; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Suitability of Apple Pomace and Oak Chips for the Production of Aged Apple Liqueur. **Journal of Food Measurement & Characterization**, 2024.

LAO, Y.; ZHANG, M.; LI, Z.; BHANDARI, B. A novel combination of enzymatic hydrolysis and fermentation: Effects on the flavor and nutritional quality of fermented *Cordyceps militaris* beverage. **LWT**, v. 120, p. 108934–108934, 2019.

LIU, M.; TIAN, X.; HE, L.; LI, C.; TAO, H.; WANG, X.; QIAO, S.; ZENG, X. Effects of tandem fermentation of edible mushroom and *L. plantarum* on sensory, polysaccharide, vitamin C, and  $\gamma$ -aminobutyric acid of *Rosa roxburghii* Tratt and coix seed beverage. **Food Chemistry X**, v. 20, p. 101041–101041, 2023.

MAKHAMRUEANG, N.; SIRILUN, S.; SIRITHUNYALUG, J.; CHAIYANA, W.; WANGCHAROEN, W.; PEERAJAN, S.; CHAIYASUT, C. *Lactobacillus plantarum* SK15 as a Starter Culture for Prevention of Biogenic Amine Accumulation in Fermented Beverage Containing *Hericium erinaceus* Mushroom. **Applied Sciences**, v. 11, n. 15, p. 6680, 2021.

MAPA. **Instrução normativa nº 19, de 19 de março de 2020**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Altera a complementação dos padrões de identidade e qualidade da sidra estabelecida pela instrução normativa nº 34, de 29 de novembro de 2012. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-19-de-19-de-marco-de-2020-249311199>

MAPA. **Instrução Normativa nº 34, de 29 de novembro de 2012**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MASUDA, M.; URABE, E.; HONDA, H.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1199–1205, 2007.

MEYER, B.; FERRIGNI, N.; PUTNAM, J.; JACOBSEN, L.; NICHOLS, D.; MCLAUGHLIN, J. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982.

MCKENNA, Dennis J.; JONES, Kenneth; HUGHES, Kerry. **Botanical Medicines: The Desk Reference for Major Herbal Supplements**. Routledge, 2012.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C.; SMITH, D. L. Simple Bench-Top Bioassays (Brine Shrimp and Potato Discs) for the Discovery of Plant Antitumor Compounds. **ACS Symposium Series**, p. 112–137, 1993.

MILOVANOVIĆ, I.; BRČESKI, I.; STAJIĆ, M.; KORAĆ, A.; VUKOJEVIĆ, J.; KNEŽEVIĆ, A.. Potential of *Pleurotus ostreatus* mycelium for selenium absorption. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/681834.

MOHD AZRIE, A.; NIK NURUL NAJIHAH NIK MAT, D.; NURUL IZZATI MOHD, I.; POH GUAT, C.; MOHD FAKHRULDDIN, I.; SHIAMALA DEVI, R. Antioxidant and cytotoxicity activity of *Cordyceps militaris* extracts against human colorectal cancer cell line. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 2020.

NHAN, N. P. T.; QUY, N. N.; THUY, D. T. K.; THOA, P. T. M.; LONG, T. B. Instant Tea Formulation from *Cordyceps militaris* Extract via Convection Drying. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 65, n. 7, 11 dez. 2021.

NOGUEIRA, A.; ZARDO, D. M.; KVITSCHAL, M. V.; COUTO, M.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A. Diversificação de negócios na propriedade frutícola: processamento de maçã. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 18734–18742, 2019. DOI: 10.34117/bjdv5n10-118.

**ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DA VINHA E DO VINHO (OIV)**. Código internacional de práticas enológicas. Paris: OIV, 2021. Disponível em: <https://www.oiv.int/publications/codigo-internacional-de-praticas-enologicas>.

OSTROM, M. R.; CONNER, D. S.; HELEENE TAMBET; SMITH, K. S.; SIRRINE, J. R.; HOWARD, P. H.; MILLER, M. Apple Grower Research and Extension Needs for Craft Cider. **HortTechnology**, v. 32, n. 2, p. 147–157, 4 fev. 2022.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PAVLEEN, K.; GUPTA, M.; SHARMA, M.; GUPTA, S.; B.S. MANOJ. Nutritional composition of in-vitro grown fruit bodies of *Cordyceps militaris* for health and wellness. **Mushroom Research**, v. 33, n. 1, p. 55–61, 2024.

PIERCE, J. S. Institute of Brewing: Analysis Comitee Measurement of Yeast Viability. **Journal of Istitute of Brewing**, v. 76, n°5, p. 442-443, 1970.

PIETROWSKI, G. A. M.; dos 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, n. 39, p. 9815-9821, 2012.

PINTO, T.; VILELA, A. Healthy Drinks with Lovely Colors: Phenolic Compounds as Constituents of Functional Beverages. **Beverages**, v. 7, n. 1, p. 12–12, 23 fev. 2021.

RAETHONG, N.; WANG, H.; NIELSEN, J.; VONGSANGNAK, W. Optimizing cultivation of *Cordyceps militaris* for fast growth and cordycepin overproduction using

rational design of synthetic media. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 1–8, 2020.

RAMÍREZ-BREWER, D.; QUINTANA, S. E.; GARCÍA-ZAPATEIRO, L. A. Modeling and optimization of microwave-assisted extraction of total phenolics content from mango (*Mangifera indica*) peel using response surface methodology (RSM) and artificial neural networks (ANN). **Food Chemistry**: X, v. 22, p. 101420, jun. 2024.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENTTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of enology**, volume 1: the microbiology of wine and vinifications. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2006. 497 p.

RICOME, A.; SOLANO-HERMOSILLA, G.; CIAIAN, P. Benefits and costs of EU marketing standards in the cider sector. **European Commission Report**, 2022.

RIOS-CORRIPIO, G.; HERNÁNDEZ-CARRANZA, P.; RUÍZ-LOPEZ, I. I.; GUERRERO-BELTRÁN, J. Á.; OCHOA-VELASCO, C. E.. Health Benefits of Fermented Alcoholic Beverages. In: RAI, A. K.; APPAIAH, A. **Bioactive Compounds in Fermented Foods: Health Aspects**. Flórida: CRC Press, 2022. p 265 - 299

ROGER, J-M.; SABLAYROLLES, J-M.; STEYER, J-P.; BELLON-MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: Application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnol. Bioeng.**, 79 (7), 804-815, 2002.

SANTOS, C. M. E. Influência da Microbiota no perfil aromático de fermentado de maçã. **Dissertação**. Universidade Estadual de Ponta Grossa. 118 p. 2011.

SANTOS, T. P. M.; ALBERTI, A.; JUDACEWSKI, P.; ZIELINSKI, A. A. F.; NOGUEIRA, A. Effect of sulphur dioxide concentration added at different processing stages on volatile composition of ciders. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, ed. 3, p. 261 - 268, 2018.

SETHY, R. N. K.; SHARMA, R. K.; SHARMA, S.; DESWAL, R. Phytochemical and proteomic analysis of a high-altitude medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*. **Journal of Proteins And Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 187-97, 2016.

SILVA, K. M. da; ZIELINSKI, A. A. F.; BENVENUTTI, L.; BORTOLINI, D. G.; ZARDO, D. M.; BELTRAME, F. L.; NOGUEIRA, A.; ALBERTI, A. Effect of fruit ripening on bioactive compounds and antioxidant capacity of apple beverages. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 294–300, jun. 2019.

SHASHIREKHA, M N; MALLIKARJUNA, S E.; S. RAJARATHNAM. Status of Bioactive Compounds in Foods, with Focus on Fruits and Vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1324–1339, 2013.

SHRESTHA, B.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; LIU, X. What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)? *Mycology*, v. 1, n. 4, p. 228–236, 2010. DOI: 10.1080/21501203.2010.536791.

SHRESTHA, B.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; LIU, X. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: Research and development. **Mycological Progress**, v. 11, n. 3, p. 599–614, 2012. DOI: 10.1007/s11557-012-0825-y.

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

Statista 2018. Consumers of cider in the United States 2018, by age. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/228267/strong-cider-consumption-usa/>

STANZER, D.; ČIČA, K. H.; MILENKO BLESIC; MIRELA SMAJIC MURTIĆ; JASNA MRVČIĆ; NERMINA SPAHO. Alcoholic Fermentation as a Source of Congeners in Fruit Spirits. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 1951–1951, 2023.

SRIVASTAVA, A.; ATTRI, B. L.; SHARMA, V. P. Status report on mushroom-based nutraceutical products in the market. **Mushroom Research**, v. 28, n. 2, 2020.

SU, W.-Y.; GAO, S.-Y.; ZHAN, S.-J.; WU, Q.; CHEN, G.-M.; HAN, J.-Z.; LV, X.-C.; RAO, P.-F.; NI, L. Evaluation of Volatile Profile and In Vitro Antioxidant Activity of Fermented Green Tea Infusion With *Pleurotus sajor-caju* (Oyster Mushroom). **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 14 abr. 2022.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. São Paulo - SP: Artmed, 2013.

TEIXEIRA, J. F. A levedura *saccharomyces cerevisiae*: caracterização do gênero, domesticação e importância na composição de vinhos. Monografia, **Especialização**. Belo Horizonte, 55p., 2015.

TSAI, Y. S.; HSU, J. H.; LIN, D. P. C.; CHANG, H. H.; CHANG, W. J.; CHEN, Y. L.; CHEN, C. C. Safety Assessment of HEA-Enriched *Cordyceps cicadae* Mycelium: A Randomized Clinical Trial. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 127–132, 2020.

UDHAV, G. V.; MALI, V. P. Some wood-rotting fungi from Gautala Autram ghat Sanctuary, Maharashtra (India). **BIOINFOLET - A Quarterly Journal of Life Sciences**, v. 18, n. 3, p. 398–403, 2014.

VERARDO, V.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; TABANELLI, G. Bioactive Components in Fermented Foods and Food By-Products. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 153–153, 2020.

VERNI, M.; VERARDO, V.; RIZZELLO, C. How Fermentation Affects the Antioxidant Properties of Cereals and Legumes. **Foods**, v. 8, n. 9, p. 362–362, 2019.

- XIN, Y.-H.; ZHAO, S.-H.; YANG, J.; ZHANG, T.-D.; ZHANG, J.-H.; WANG, Y. Effect of microwave-drying on the quality and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* fermented sea-buckthorn tea. **International Journal of Food Engineering**, v. 17, n. 1, p. 65–74, 18 ago. 2020.
- WANG, F.; LIU, Q.; ZHANG, J.; LIU, K.; LI, K.; LIU, G.; DONG, C. Comparative transcriptome analysis between a spontaneous albino mutant and its sibling strain of *Cordyceps militaris* in response to light stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1237, 2018.
- WANG, D.; ZHANG, M.; ADHIKARI, B.; ZHANG, L. Determination of polysaccharide content in shiitake mushroom beverage by NIR spectroscopy combined with machine learning: A comparative analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 122, p. 105460–105460, 8 jun. 2023.
- WANG, C.; BIN, Z.; WANG, L.; ZHU, G.; TANG, S.; CHEN, Y.; XIAO, D.; GUO, X. Metagenomic and metabolomic profiling analyses to unravel the formation mechanism of n-propanol during the first and second round of Jiangxiangxing Baijiu fermentation. **Food Research International**, v. 200, p. 115459–115459, 2024.
- WEI, J.; ZHANG, Y.; QIU, Y.; GUO, H.; JU, H.; WANG, Y.; YUAN, Y.; YUE, T. Chemical composition, sensorial properties, and aroma-active compounds of ciders fermented with *Hanseniaspora osmophila* and *Torulaspora quercuum* in co- and sequential fermentations. **Food Chemistry**, v. 306, p. 125623–125623, 2020.
- WEN, T.-C.; LI, G.-R.; KANG, J.-C.; KANG, C.; HYDE, K. Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and Cordycepin Production by *Cordyceps militaris*. **Chiang Mai J. Sci**, v. 41, n. 4, p. 858–872, 2014.
- WEN, Z.; DU, X.; MENG, N.; LI, Y.; MI, R.; LI, X.; SUN, Y.; MA, S.; LI, S. Tussah silkmoth pupae improve anti-tumor properties of *Cordyceps militaris* (L.) Link by increasing the levels of major metabolite. **RSC Advances**, v. 9, n. 10, p. 5480–5491, 2019. DOI: 10.1039/c8ra09491h. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/ra/c8ra09491h>.
- XIAO, J.-H.; XIAO, D.-M.; SUN, Z.-H.; XIONG, Q. Chemical compositions and antimicrobial property of three edible and medicinal Cordyceps species. **J Food Agric Environ**, v. 7, n. 3&4, p. 91-100, 2009.
- YI, X.; XI-ZHEN, H.; JIA-SHI, Z. Randomized double-blind placebo-controlled clinical trial and assessment of fermentation product of *Cordyceps sinensis* (Cs-4) in enhancing aerobic capacity and respiratory function of the healthy elderly volunteers. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 10, n. 3, p. 187–192, 2004. DOI: 10.1007/bf02836405.
- XU, J.; QI, Y.; ZHANG, J.; LIU, M.; WEI, X.; FAN, M. Effect of reduced glutathione on the quality characteristics of apple wine during alcoholic fermentation. **Food Chemistry**, v. 300, p. 125130–125130, 2019.

YANG, Y.; BU, N.; WANG, S.; ZHANG, J.; WANG, Y.; DONG, C. Carotenoid Production by Caterpillar Medicinal Mushrooms, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), under Different Culture Conditions. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 22, n. 12, p. 1191–1201, 2020.

YU, R.; SONG, L.; ZHAO, Y.; BIN, W.; WANG, L.; ZHANG, H.; WU, Y.; YE, W.; YAO, X. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 465–472, 2004. DOI: 10.1016/j.fitote.2004.04.003.

YU, X.; MAO, Y.; SHERGIS, J. L.; COYLE, M. E.; WU, L.; CHEN, Y.; ZHANG, A. L.; LIN, L.; XUE, C. C.; XU, Y. Effectiveness and Safety of Oral *Cordyceps sinensis* on Stable COPD of GOLD Stages 2-3: Systematic Review and Meta-Analysis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/4903671.

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

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

ZHANG, H. W.; LIN, Z. X.; TUNG, Y. S.; KWAN, T. H.; MOK, C. K.; LEUNG, C.; CHAN, L. S. *Cordyceps sinensis* (a traditional Chinese medicine) for treating chronic kidney disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 12, 2014. DOI: 10.1002/14651858

ZHAO, Y.; LI, S.-L.; CHEN, H.-Y.; ZOU, Y.; ZHENG, Q.-W.; GUO, L.-Q.; WU, G.-H.; LU, J.; LIN, J.-F.; YE, Z.-W. Enhancement of carotenoid production and its regulation in edible mushroom *Cordyceps militaris* by abiotic stresses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, p. 109808, 2021.

ZHENG, P.; XIA, Y.; XIAO, G.; XIONG, C.; HU, X.; ZHANG, S.; ZHENG, H.; HUANG, Z.; HUANG, Y.; ZHOU, Y.; WANG, S.; ZHAO, G.-P.; LIU, X.; LEGER, R. J. S. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. **Genome Biology**, v. 12, n. 11, 2011. DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r116.

ZHOU, X. W.; LI, L. J.; TIAN, E. W. Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 233–243, 2014. DOI: 10.3109/07388551.2013.791245

ZURIARRAIN, A.; ZURIARRAIN, J.; PUERTAS, A. I.; MARÍA TERESA DUEÑAS; IÑAKI BERREGI. Quantitative determination of lactic and acetic acids in cider by <sup>1</sup>H NMR spectrometry. **Food Control**, v. 52, p. 49–53, 2015