

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

CÍNTIA MAIA BRAGA

**PERFIL AROMÁTICO DE SUCOS E FERMENTADOS DE MAÇÃ EM
DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

PONTA GROSSA

2013

CÍNTIA MAIA BRAGA

**PERFIL AROMÁTICO DE SUCOS E FERMENTADOS DE MAÇÃ EM
DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

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

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

PONTA GROSSA

2013

B813 Braga, Cíntia Maia
Perfil aromático de sucos e fermentados de maçã em diferentes estádios de
maturação /Cíntia Maia Braga. Ponta Grossa, 2012.
52 f. .

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira.

1.Sidra. 2. Compostos voláteis. 3. Cromatografia gasosa. 4.Análise
multivariada. I. Nogueira, Alessandro. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 634.11

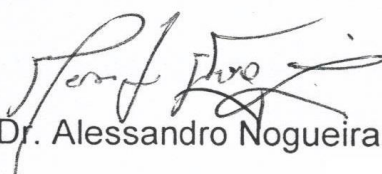
TERMO DE APROVAÇÃO

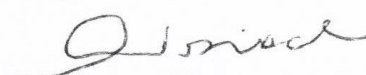
Cíntia Maia Braga

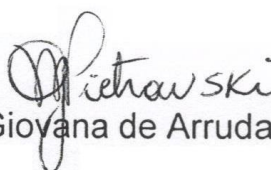
PERFIL AROMÁTICO DE SUCOS E FERMENTADOS DE MAÇA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO

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

Orientador


Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG


Prof. Dr. Gilvan Wosiacki - UEPG


Profa. Dra. Giovana de Arruda Moura Pietrowski - UTFPR

Ponta Grossa, 14 de fevereiro de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que me deram todo o apoio e incentivo,
os responsáveis por toda a minha dedicação
e aos quais devo todas as conquistas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro Nogueira que me incentivou a seguir esta carreira e tanto me ensinou desde a iniciação científica.

À Prof. Dra. Giovana de Arruda Mora Pietrowski pelo apoio técnico, científico e toda a disposição para ajudar em todos os momentos, além de todo o carinho e amizade também muito importantes nesta caminhada.

Ao Prof. Dr. Gilvan Wosiacki pela confiança e incentivo.

Aos colegas Acácio Antônio Ferreira Zielinski e Karolline Marque da Silva pelo companheirismo desde a coleta das maçãs até na escrita do trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica Frederico Koch Fernandes de Souza e Alana Lung pela dedicação no desenvolvimento de análises.

Ao meu tio Msc. José Valter Pereira Maia pela ajuda e apoio imensuráveis na finalização do trabalho.

Ao Mauro Rodrigues Salvador Filho pelo apoio técnico na configuração do trabalho e toda paciência e apoio durante todo o mestrado.

Aos colegas do Grupo de Trabalho sobre Maçãs por todo apoio e companheirismo.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante os dois anos de pós-graduação.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Ponta Grossa pela infraestrutura.

À Agrícola Boutin e à EPAGRI pelo fornecimento das maçãs.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Fermentados de maçãs são produzidos no Brasil com frutas de baixa qualidade comercial que não passam por classificação quanto ao grau de maturação. Sabe-se que isto pode alterar a qualidade tecnológica e sensorial do produto tornando necessário um estudo para determinação do perfil aromático dos produtos processados com maçãs em diferentes estádios de maturação. O objetivo deste estudo foi identificar e determinar as diferenças de perfil aromático entre sucos e fermentados de maçã elaborados com frutas de diferentes cultivares e estádios de maturação. Para isto foram realizadas análises para determinação do estágio de maturação da fruta, determinação do perfil aromático, composição físico-química e análise estatística para verificação e determinação das diferenças entre os sucos e fermentados. O teor de açúcar dos sucos e de álcool dos fermentados em geral aumentaram com o amadurecimento, o oposto da evolução dos ácidos que, na maioria das amostras decresceu com o amadurecimento, tal como aconteceu com o teor de nitrogênio. O estágio de maturação influenciou significativamente a composição aromática de suco e fermentado de maçã. Ésteres, aldeídos, ácidos, álcoois e cetonas foram identificados em todas as amostras por cromatografia gasosa (GC), porém em concentrações mais elevadas em amostras de fermentado, principalmente a partir de maçãs senescentes. Em relação aos sucos, Gala madura teve um destaque com relação à concentração de aromas sobre outras cultivares. Através de uma abordagem quimiométrica por análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi verificado que os fermentados tem uma maior concentração de dez dos compostos voláteis avaliados e menos concentração de apenas um composto em relação ao suco de maçã. Desta forma abordagem quimiométrica com técnicas de GC podem ser parâmetros adequados para diferenciar suco e fermentado de maçã por perfil aromático.

Palavras-chaves: sidra, compostos voláteis, cromatografia gasosa, análise multivariada.

ABSTRACT

Apple fermented beverages are produced in Brazil with low commercial quality fruits that do not pass by rating the degree of maturation. An study becomes necessary to determine the aromatic profile of the products processed apples in different stages of maturation knowing that this can change the technological and sensory quality of the product. Thus the aim of this study was to identify and determine the differences between apple juices and apple fermented beverage elaborated with fruits from different varieties and ripening stages in the aroma profile. Analysis of fruit ripeness, preparation of products under different conditions, flavor profile, physico-chemical composition and statistical analysis for verification and determination of the differences between the juice and fermented were performed. The physical chemical characteristics attested the raw material ripening of the samples. The sugar content of juices and alcohol content of fermented in general increased with ripening increasing, the opposite of the evolution of acids that in most of the samples decreased with increasing ripening, as happened with the nitrogen content. Ripening stage significantly influenced the aroma composition of apple juice and apple fermented beverages. Esters, aldehydes, acids, alcohols and ketones were identified in all samples by gas chromatographic (GC), however at higher concentrations in samples of fermented mainly made of senescent apples. Regarding the juices, ripe *Gala* had a prominence relating to aroma concentration over other cultivars. Using a chemometric approach by principal components analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were verified that fermented have a higher composition of ten volatile compounds avaliated and fewer concentration of just one compound than apple juices. In this way chemometric approach with GC techniques can be suitable parameters to differentiate apple juice and apple fermented by aroma profiles.

Keywords: cider, volatiles compounds, gas chromatographic, multivariate techniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sequência de fatias de maçã com diferentes graus de maturação expressos em termos de amido	19
Figura 2 - Bar graphics comparing apple juices (A) and fermented beverage samples (B).....	46
Figura 3 - A scatter plot of PC 1 vs. PC 2 of the main sources of variability between the apple juice and fermented apple samples.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Physicochemical characteristics of Fuji Suprema, Lisgala and Gala apple juices at different ripening stages.	40
Tabela 2 - Concentration of volatile compounds of apple juice samples made from Fuji Suprema, Lisgala or Gala apple varieties at unripe, ripe and senescent maturation stages ^a	44
Tabela 3 - Concentration of volatile compounds of fermented apple made of Fuji Suprema, Lisgala or Gala apple varieties at unripe, ripe and senescent maturation stages ^a	44
Tabela 4 - Aroma compounds of apple juices and fermented apple beverages.	48

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	9
CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	10
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1 MAÇÃS PARA PROCESSAMENTO	11
1.2 FERMENTADO DE MAÇÃ	12
1.3 AROMAS	13
1.3.1 Aromas em fermentado de maçã	14
1.3.2 Efeitos do grau de maturação nos aromas	17
1.4 CROMATOGRAFIA GASOSA	19
1.5 ANÁLISE MULTIVARIADA	20
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO II: CLASSIFICAÇÃO DE SUCOS E FERMENTADOS DE MAÇÃ, POR PERFIL AROMÁTICO, ELABORADOS COM FRUTAS VERDES, MADURAS E SENESCENTES ATRAVÉS DE ANÁLISE MULTIVARIADA.	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUCTION	30
2. MATERIALS AND METHODS	32
2.1. MATERIALS	32
2.2. PROCESSING.....	33
2.2.1. Processing of apple juice	33
2.2.2. Processing of fermented apple beverage	33
2.3. INSTRUMENTAL ANALYSIS	33
2.3.1. Collection of volatile compounds – headspace.....	33
2.3.2. Chromatographic analysis of volatile compounds.....	34
2.3.3 Chromatographic analysis of sugar and alcohol	35
2.4. PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS	36
2.5. STATISTICAL ANALYSIS	36
3. RESULTS AND DISCUSSION	38
4. CONCLUSION	49
REFERENCES	50

INTRODUÇÃO

A maçã, fruta de clima temperado cultivada no Brasil, principalmente na região Sul, apresentou expansão em área plantada e em volume de produção nos últimos anos.

As frutas desclassificadas para o consumo *in natura* são destinadas ao processamento de suco e fermentado de maçã. Assim sendo as frutas muitas vezes, além de defeitos morfológicos podem apresentar defeitos fitopatológicos como podridões e presença de microrganismos contaminantes.

Na indústria de fermentado de maçã não existe nenhuma forma de classificação destas frutas quanto à variação do grau de maturação. Maçãs para o consumo *in natura* são colhidas maduras ou em estágio de pré-maturação para terminar o amadurecimento em câmaras frias ou atmosfera controlada. As frutas desclassificadas neste processo, juntamente com as retiradas no processo de raleio do pomar, são destinadas ao processamento de bebida fermentada, caracterizando matéria-prima em pré-maturação ou madura dependendo da época do ano. O estágio de senescência acontece pela exposição ao sol nos pátios de processamento ou problemas no armazenamento em câmaras frias ou atmosfera controlada, fator este que também aumenta a porcentagem de podridão. Visto que o estágio de maturação modifica a composição volátil dos frutos em geral, é esperado que este fato altere o perfil aromático dos fermentados de maçã em diferentes épocas do ano.

Estas condições da matéria-prima estão relacionadas a vários problemas referentes à qualidade dos produtos da maçã. A produção de suco e fermentado de maçã nas condições de processamento brasileiras com relação aos efeitos de maturação no perfil aromático muito pouco foi estudada. Portanto, compostos chave podem ser identificados a fim de indicar ou atestar a qualidade da matéria-prima.

Uma melhor compreensão da influência de amadurecimento em componentes de aroma pode melhorar tanto as técnicas de processamento de sidra quanto a qualidade do produto final. Assim, é verificada a importância de identificar e determinar as diferenças entre sucos e fermentados de maçã elaborados com frutas de diferentes cultivares e estágios de maturação no perfil aromático.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar diferenças no perfil aromático de sucos e fermentados de maçã elaborados com frutas de diferentes cultivares e estádios de maturação.

Objetivos Específicos

Determinar a influência do estágio de maturação nas características físico-químicas das amostras.

Determinar a influência do estágio de maturação na composição aromática dos sucos e fermentados de maçã.

Determinar as diferenças entre sucos e fermentados de maçã elaborados com frutas de diferentes cultivares e estádios de maturação no perfil aromático usando análise multivariada

CAPÍTULO I: Revisão bibliográfica.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 MAÇÃS PARA PROCESSAMENTO

A maçã, fruta de clima temperado cultivadas no Brasil, aquela que apresentou maior expansão em área plantada e em volume de produção de 1990 a 2010. Na safra 2009/2010 foram produzidas 1.274.705 toneladas de frutas correspondendo a 39.154 ha de área plantada. A maior concentração do cultivo está na Região Sul, sendo Santa Catarina o maior produtor,. O Rio Grande do Sul é o segundo estado produtor, seguido pelo Paraná. A maior parte da produção provém de duas cultivares: Gala e Fuji, representado 55% e 40% da produção respectivamente (ABPM, 2011; Dos SANTOS, 2011).

As maçãs destinadas ao processamento de fermentado, conhecidas como maçãs industriais, são frutas oriundas do descarte comercial que não apresentaram aspectos físicos e microbiológicos desejáveis para o consumo *in natura* no momento da colheita ou após um período de armazenamento em câmaras frias (NOGUEIRA e WOSIACKI, 2010).

Nogueira et al., (2003) não observaram preocupações com o desenvolvimento de cultivares de interesse comercial mais voltadas aos procedimentos industriais, pois nem todas as cultivares de mesa são recomendáveis para obtenção de sucos ou produtos fermentados.

Estas situações da condição da matéria-prima relacionam-se a vários problemas referentes à qualidade dos produtos de frutas. Foram identificados compostos aromáticos chave relacionados a podridão ácida de uvas (BARATA et al., 2011).

As maçãs, frutas favorecidas, não apenas por causa de suas boas propriedades de armazenagem e fabricação, mas também devido às suas características de aroma único. Os constituintes voláteis mais encontrados em maçãs correspondem de ésteres (78-92% de voláteis totais), álcoois (6-16% de voláteis totais), aldeídos, cetonas e éteres (RITA et al., 2011).

Fatores ambientais, cultivar, grau de maturação da matéria-prima, etapas do processamento (prensagem, tratamento enzimático, clarificação, tratamentos térmicos) e condições de armazenamento afetam a composição e concentração dos compostos voláteis nas frutas. As diferentes etapas do processamento podem causar mudanças no perfil aromático do produto final quando comparado com a fruta fresca (JANZANTTI et al., 2003; Dos SANTOS, 2011; PIETROWSKI et al., 2012).

Os voláteis de aromas têm se tornado cada vez mais importantes para as compras de maçãs. Aroma tem sido objeto de muita pesquisa (XIABO; JIEWEN, 2008), porém nos produtos da maçã nas condições de processamento brasileiras pouco foi estudado,

principalmente com relação aos efeitos de maturação no perfil aromático de suco e fermentado de maçã. Portanto, compostos chave podem ser identificados a fim de indicar ou atestar a qualidade da matéria-prima.

Gala, uma cultivar precoce, altamente aromática tem um sabor muito doce e uma textura firme enquanto madura. 'Fuji' é uma cultivar doce, saborosa, tem uma baixa taxa de perda de firmeza e um longo prazo de validade e armazenamento. Isto pode estar associado com a sua evolução de etileno baixa e baixas taxas de respiração (Lin; Walsh, 2008).

'Gala' e 'Fuji' foram escolhidas para o estudo de Lin e Walsh (2008) por ser cultivares relativamente novas, e possui interesse comercial e valor para intuito industrial. Ambas têm como ancestral comum a cultivar 'Delicious' e não são propensas a queda antes da colheita.

A maior parte da produção brasileira provém das cultivares: Gala e Fuji, representado 55% e 40% da produção respectivamente (ABPM, 2011).

1.2 FERMENTADO DE MAÇÃ

A sidra é definida como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã fresca, sã e madura, do suco concentrado de maçã ou ambos, com ou sem a adição de água com graduação alcoólica de 4 a 8% em volume, a 20 °C (BRASIL, 2009).

De acordo com Nogueira (2003), a região oeste francesa detém a reputação de produzir uma das melhores sidras do mundo, caracterizada pelo sabor suave, adstringente (tânicos) e aromas frutados. Entretanto, em países de língua alemã (Alemanha e Suíça) as sidras são relativamente secas e ácidas. No Brasil, o produto apareceu na primeira metade do século XX, é suave, pouco aromático e com baixa acidez, uma vez que é produzido essencialmente de maçãs de mesa (MANGAS et al., 1999; LEA e DRILLEAU, 2003; NOGUEIRA et al., 2006). Segundo esses autores, poucos trabalhos foram realizados sobre o processamento e a qualidade da sidra no Brasil, e a maior parte foi desenvolvida por enólogos contratados pelas indústrias interessadas na comercialização das frutas visando o processamento das maçãs de descarte. Os produtos nos países França, Alemanha, Espanha e Brasil, apesar de possuir especificações restritas, diferenciam-se entre si. (SIMÕES, 2008).

No Brasil não existe produção industrial de sidra varietal. As maçãs de mesa descartadas servem de matéria-prima para o processamento de sidra, diversificada e processada, conforme a disponibilidade das cultivares durante a safra (CHIQUELLO, 2004).

Em países europeus, utiliza-se frutas de cultivares selecionadas para a obtenção de suco e sidras, usando como marcadores de qualidade industrial os teores de acidez, taninos e

açúcares. Esses componentes evidenciam a qualidade do produto e envolvem critérios de cor, sabor e aromas, atributos envolvidos no processo de compra e no hábito dos consumidores (PAGANINI et al., 2004).

1.3 AROMAS

Aroma, a sensação percebida pelos sentidos do gosto e olfato, produzida quando se ingere o alimento, corresponde a um dos atributos mais importantes dos alimentos e bebidas (SIMÕES, 2008).

Substâncias voláteis podem ser originadas em todas as fases de produção de alimentos. Elas encontram-se nas matérias-primas, podem ser introduzidas durante o processo tecnológico ou sintetizadas durante o armazenamento de produtos alimentares. Entre os componentes de qualidade organolépticas, sabor ocupa um lugar de destaque para o consumidor. Sabor corresponde às sensações de odor e paladar recebidos quando se ingere o alimento. A presença, o teor e a composição das substâncias voláteis em alimentos têm uma influência substancial sobre a sua qualidade. Uma análise do odor pode constituir uma valiosa fonte de informação referente à qualidade sanitária dos alimentos, o que inclui tanto a característica organoléptica quanto segurança e saúde do consumidor (PLUTOWSKA; WARDENCKI, 2007; ABRODO et al., 2010).

As moléculas de aromas apresentam diferentes funções químicas e grupos reativos, como por exemplo alcóois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas, pirazinas, terpenos, compostos sulfurados, pironas e furanos (PINHEIRO; PASTORE, 2003).

O aroma da maçã está definido por compostos químicos voláteis (BALDWIN, 2002). Estes estão presentes na fase gasosa (KAYS; PAULL, 2004), de maneira que as moléculas possuem capacidade de alcançar o epitélio olfativo nasal por diferentes caminhos. O primeiro, no qual as moléculas voláteis são diretamente aspiradas pelo nariz, interagindo com os receptores produzindo a sensação conhecida como odor. O segundo, no qual as substâncias voláteis liberadas pelos alimentos na boca alcançam o epitélio olfativo pela rota nasal, produzindo a sensação conhecida como aroma (CROUZET et al., 1984; SALAZAR; OROZCO, 2011).

A qualidade da maçã abrange atributos visuais como aparência, tamanho, uniformidade e cor; e atributos não visuais como o sabor, aroma e textura (CUNNIGHAM et al., 1986). Sabor e aroma, diretamente ligados, determinam a aceitação do consumidor quando excedem as expectativas e a compra se repete (SALAZAR; OROZCO, 2011). Sendo assim os

voláteis se tornam importantes, sendo os responsáveis diretos pelo *flavor* e aroma característico da fruta, esperados pelo consumidor de algum produto proveniente da maçã.

O principal aroma da maçã deve-se a quatro ésteres: o acetato de etila, o acetato de isoamil, o hexanoato de etila e o acetaldeído (FRAILE et al., 2000).

Foram identificados aproximadamente 400 compostos voláteis na maçã (FORNEY et al., 2009), os quais estão presentes em quantidades de parte por milhão (KAYS e PAULL, 2004). A síntese destes compostos voláteis ocorre por vias bioquímicas com diferentes enzimas e substratos, sendo os ácidos graxos os principais precursores, são catabolizados pelas principais rotas oxidativas: β -oxidação e lipoxigenase (PÉREZ e SANZ, 2008). A partir de aminoácidos sintetizam-se compostos voláteis como ésteres de cadeia ramificada (WYLLIE e FELLMAN, 2000). A síntese dos compostos voláteis pode ser alterada por diferentes fatores na pré-colheita e na colheita (KAYS e PAULL, 2004; SALAZAR e OROZCO, 2011).

De todos os compostos voláteis encontrados na maçã apenas entre 20 e 40 têm um impacto decisivo na qualidade sensorial da fruta, chamados compostos de impacto, dentre eles acetato de butila, acetato de 2-metilbutila e acetato de hexila, que contribuem ao aroma característico da maioria das variedades de maçãs (CUNNIGHAM et al., 1986; FELLMAN et al., 2000; SALAZAR e OROZCO, 2011).

Os compostos voláteis que caracterizam o aroma do suco de maçã são: trans-2-hexenal, cis-3-hexenal, trans-2-hexenol, cis-3-hexenol, etil butirato e etil-2-metil-butirato. Os compostos voláteis desejáveis para o aroma de suco de maçã são: hexenal, benzaldeído, propilbutirato, pentilacetato, 2-pentanona e isobutilacetato. Os compostos de maior intensidade do aroma são: trans-2-hexenal, cis-3-hexenal, isobutanol e isobutilacetato (DÜRR e SCHOBINGER, 1981; SIMÕES, 2008).

1.3.1 Aromas em fermentado de maçã

Sidra é o produto de suco de maçã fermentado e gaseificado natural ou artificialmente. Compostos aromáticos desempenham um papel na qualidade da sidra. O aroma de sidra tem um padrão químico complexo, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos. Além disso, os principais compostos aromáticos de sidras possuem uma relação com o tipo e concentração de compostos aromáticos derivados de maçãs, fermentação e estágio de armazenamento, e que consiste em ésteres, alcoóis superiores, ácidos graxos, cetonas, aldeídos, terpenos e lactonas, por exemplo (PENG et al., 2009).

Os ésteres formados por fungos e leveduras são exemplos de metabólitos secundários produzidos por microrganismos como a maioria dos compostos voláteis. A produção de ésteres seria o mecanismo responsável pela remoção de ácidos e alcoóis da célula e do meio, pois se houvesse acúmulo desses compostos, poderia ser tóxico para a célula. As condições de cultivo, tais como composição do meio (fonte de carbono, nitrogênio e outros elementos), pH, tempo de fermentação, temperatura de incubação, agitação e aeração, foram identificados como fatores determinantes do tipo e da quantidade dos compostos de aromas produzidos, além da linhagem do microrganismo. Essas variáveis podem estar envolvidas nos mecanismos fisiológicos que influenciam os tipos e quantidades dos produtos formados pelos microrganismos (MARQUES e PASTORE, 1999; Dos SANTOS, 2011).

Muitos dos compostos aromáticos de maçãs são perdidos no processamento e a maior parte dos compostos aromáticos em sidras é sintetizada durante a fermentação (WILLIAMS; TUCKNOTT, 1977).

Aroma é um dos indicadores de identidade e qualidade de bebidas alcoólicas mais importantes (FAN et al., 2011). Em bebidas alcoólicas alguns desses compostos têm origem no próprio fruto enquanto outros gerados durante o processo fermentativo e outros ainda provenientes de reações químicas durante o envelhecimento (GARRUTI, 2001).

Em produtos de maçã, como o suco e a sidra, os fenóis apresentam considerável interesse devido sua influência nas características sensoriais (cor, gosto amargo e adstringência), na formação de certos aromas e na transparência das bebidas (SIMÕES, 2008).

Os três compostos voláteis quantificados em maior concentração em amostras de sidras chinesas foram 3-metilbutanol, 2-feniletanol e ácido hexanóico. Os ésteres foram os compostos voláteis dominantes em sidras. O acetato de etila, derivado de etanolise de acetil Co-A, foi o éster mais comum encontrado em sidras. Compostos associados com sabor desejável são acetato de butila, 3-metil butil acetato, hexil acetato, etil butanoato. Hexanoato de etila transmite uma nota frutável, e poderia ser associado com processo de fermentação e cepa de levedura envolvida. O segundo grande grupo foi de alcoóis. O composto 1-butanol é o composto primário de maçãs. Esta concentração não depende da tecnologia de processamento e sim da cultivar e maturidade. O álcool 3-metilbutanol é considerado quantitativamente um importante álcool em sidras chinesas, enquanto 1-hexanol é considerado um composto volátil característico de outras frutas e é produzido durante a oxidação enzimática do ácido linoleico (FAN; XU; HAN, 2011).

Os compostos que contribuem para o aroma em sidras encontrados por Xu et al. (2007) foram 2-feniletanol, ácido butanóico, ácido octanóico, 2-metil butanoato, etil butanoato, etil hexanoato, 4-etilguaicol, eugenol, e 4-vinilfenol.

Segundo Herrero, García e Díaz (2006), os compostos voláteis álcoois superiores, ésteres e compostos carbonilas, formados durante fermentação, produzidos principalmente pelo metabolismo de leveduras, afetam as características organolépticas de sidras. Reações de decarboxilação e redução têm como derivados os compostos carbonilas, enquanto oxidação aumenta alguns ácidos e alcoóis. Entre ésteres, o acetato de etila destaca-se por ser um dos compostos mais significantes que afetam o aroma em bebidas fermentadas. Etanol, o álcool dominante em sidra, pela etanólise de acetil-CoA, produz acetato de etila, o éster mais abundante. Porém quando em níveis maiores que 200 mg/L podem afetar negativamente o aroma de vinhos. Ainda de acordo com Herrero, García e Díaz (2006), a biossíntese de álcoois superiores está ligada a metabolismo de aminoácidos. O composto 2-metil-1-propanol produz-se de valina, enquanto 2-metil e 3-metil-1-butanol derivam-se de isoleucina e leucina, respectivamente. Os álcoois superiores são quantitativamente os principais compostos voláteis em sidra e provavelmente contribuem mais para o aroma de sidra do que de cerveja, onde estão presentes em quantidades muito menores.

Os compostos aromáticos obtidos na fermentação de mosto de maçã por leveduras *H. guilliermondii* e *H. uvarum* demonstraram a presença de ésteres, aldeídos, ácidos, acetonas, e álcoois no estudo de Pietrowski et al. (2012). Ainda no mesmo estudo, os valores detectados no fermentado de maçã foram maiores do que os encontrados no mosto de maçã usado para a fermentação. Isto não ocorreu pelos resultados obtidos por micro extração em fase sólida (SPME) com butil etanoato, 1-hexanol, e 2-heptanona, que parece ter isso metabolizado pelas leveduras usadas no trabalho. Isto também não ocorreu com hexil etanoato, que apresentou a mesma concentração no mosto e no fermentado usando *H. uvarum* pelo método de SPME.

Os compostos voláteis acetato de butila, 2-metil butil acetato, hexil acetato, etil hexanoato, e hexil hexanoato foram os principais compostos identificados no estudo de Crook e Boylston (2004), confirmando que acetatos, butanoatos e outros esters comumente aparecem em maçãs e produtos de maçãs.

Butanoato de propila, fenil acetaldeído, acetato de propila e pentanoato de butila foram reconhecidos como contribuidores predominantes para o sabor de sidras, e apresentam-se em níveis substancialmente menores do que outros esteres que contribuem para o aroma característico de maçã (CROOK; BOYLSTON, 2004).

Uma alta concentração de acetato de etila prejudica a qualidade sensorial, como o odor deste composto descreve-se como colante; embora a baixas concentrações percebe-se como aroma de fruta (MADRERA et al., 2010).

A análise dos aromas voláteis constituintes de alimentos e bebidas é uma ferramenta para estudar os processos envolvidos na elaboração de produtos alimentares, devido à sua influência sobre as propriedades finais sensoriais. O estudo destes compostos tem permitido a obtenção de informação confiável sobre as fases distintas no processo de fabricação, como a matéria-prima utilizada e o processo de fermentação (MADRERA et al., 2005).

Vários fatores influenciam a formação de aromas: ambiente, variedade e maturação da maçã, condições de fermentação, levedura, o processo de produção e envelhecimento da bebida (BEECH, 1993).

O amadurecimento de frutos, um processo irreversível, no qual muitas alterações são desenvolvidas, firmeza e acidez diminuem, açúcar e aroma aumentam e ocorre hidrólise do amido (LLORENTE et al., 2012).

1.3.2 Efeitos do grau de maturação nos aromas

Segundo Salazar e Orozco (2011), existem vários fatores que influenciam na síntese de compostos voláteis e entre eles se encontram o grau de maturação (PAILLARD, 1981), variedade (CUNNIGHAM et al., 1986), clima (YAHIA, 1994), fertilização (FORSYTH e WEBSTER, 1971), uso de reguladores do crescimento (ABELES et al. 1991; SISLER et al., 1996) e condições de armazenamento (YAHIA, 1994).

Substâncias aromáticas, especialmente em frutas e hortaliças, são produtos ou subprodutos de diversas rotas metabólicas. Os compostos do aroma típicos de frutos não-cítricos como as bananas, pêras, melões e maçãs são sintetizados durante a fase climatérica. Muitos ácidos alifáticos e aminoácidos das frutas verdes convertem-se em ésteres, alcóois e éteres, responsáveis pelo odor frutal característico. Na maçã um componente de impacto é o 2-metil-butirato de etila (WONG, 1995). De acordo com Simões (2008), outro composto de impacto na maçã é etil-3-metil-butirato.

A maçã como um fruto climatérico apresenta um pico típico na taxa de respiração que precede ou acontece paralelamente a um aumento auto catalítico da produção do etileno (LURIE, 1998). O amadurecimento do fruto climatérico inclui mudanças físicas, metabólicas e bioquímicas iniciadas e/ou que foram coordenados pelo etileno, tanto na árvore quanto colhidos. Estas mudanças incluem mudança de cor, amolecimento dos tecidos, desenvolvimento do gosto e aroma característicos (WILLS et al., 1997). Se colhida nos

primeiros estádios de maturação, a fruta pode não desenvolver plenamente o seu sabor e aroma característicos (BROWN et al., 1966) e por outro lado, se a fruta for colhida supermadura produz menos compostos voláteis do que uma colhida no tempo ótimo (HANSEN et al., 1992; SALAZAR e OROZCO, 2011).

Os aldeídos são os compostos voláteis predominantes em maçãs verdes (De POOTER et al., 1987), ao passo que em frutas maduras se encontram em maior concentração alcoóis e ésteres (DIXON e HEWETT, 2000; SALAZAR e OROZCO, 2011).

Nos últimos anos tem sido observado que atmosfera controlada pode prejudicar a produção de compostos voláteis característicos de aroma de maçã (FELLMAN et al., 2003; YAHIA, 1994). Baixas concentrações de oxigênio e alta concentração de dióxido de carbono no armazenamento por longos períodos proporcionam como resultado a supressão de sabor nas maçãs (FELLMAN et al., 2000; SALAZAR e OROZCO, 2011).

Amadurecimento é um processo regulado geneticamente em que ambas as alterações moleculares e bioquímicas levam à modificação física do fruto, incluindo mudanças de cor, amaciamento, e desenvolvimento de aroma e sabor característicos (SEYMOUR et al., 1993). Síntese de componentes voláteis de aroma associa-se com o amadurecimento de frutas e, portanto, dependerá do estágio de desenvolvimento no momento da colheita (DIRINCK e SCHAMP, 1989; MATTHEIS et al., 1995; ECHEVERRÍA et al., 2004).

Frutas produzem acetaldeído e etanol durante a sua maturação e amadurecimento (KE et al., 1994; SPEIRS et al., 1998; DIXON e HEWETT, 2000; ECHEVERRÍA et al., 2004).

Há vários métodos para determinar o momento melhor de início da colheita, para se obter um armazenamento prolongado, sendo normalmente utilizados testes que permitem caracterizar alterações nas características físico-químicas das frutas para cada cultivar, baseando-se em parâmetros pré-estabelecidos pela pesquisa. Dentre os numerosos testes de maturação existentes para a maçã é utilizado o índice de iodo-amido (GIRARDI et al., 2002).

Através do processo de fotossíntese, os açúcares sintetizados no processo fotossintético são polimerizados e armazenados nas frutas na forma de amido. Durante a maturação, o amido armazenado na polpa da fruta é hidrolisado, transformando-se em açúcares solúveis. Quanto mais madura a fruta, menor o conteúdo de amido e maior o de açúcar. Assim, o desaparecimento progressivo do amido da polpa permite acompanhar a evolução da maturação através de testes de reação com iodo. Desse modo, o amido se colore de azul, indicando regiões da polpa em que a hidrólise ainda não ocorreu. O processo de redução de seu teor ocorre de uma forma progressiva, de dentro para fora, sendo variável de acordo com a cultivar (GIRARDI et al., 2002).

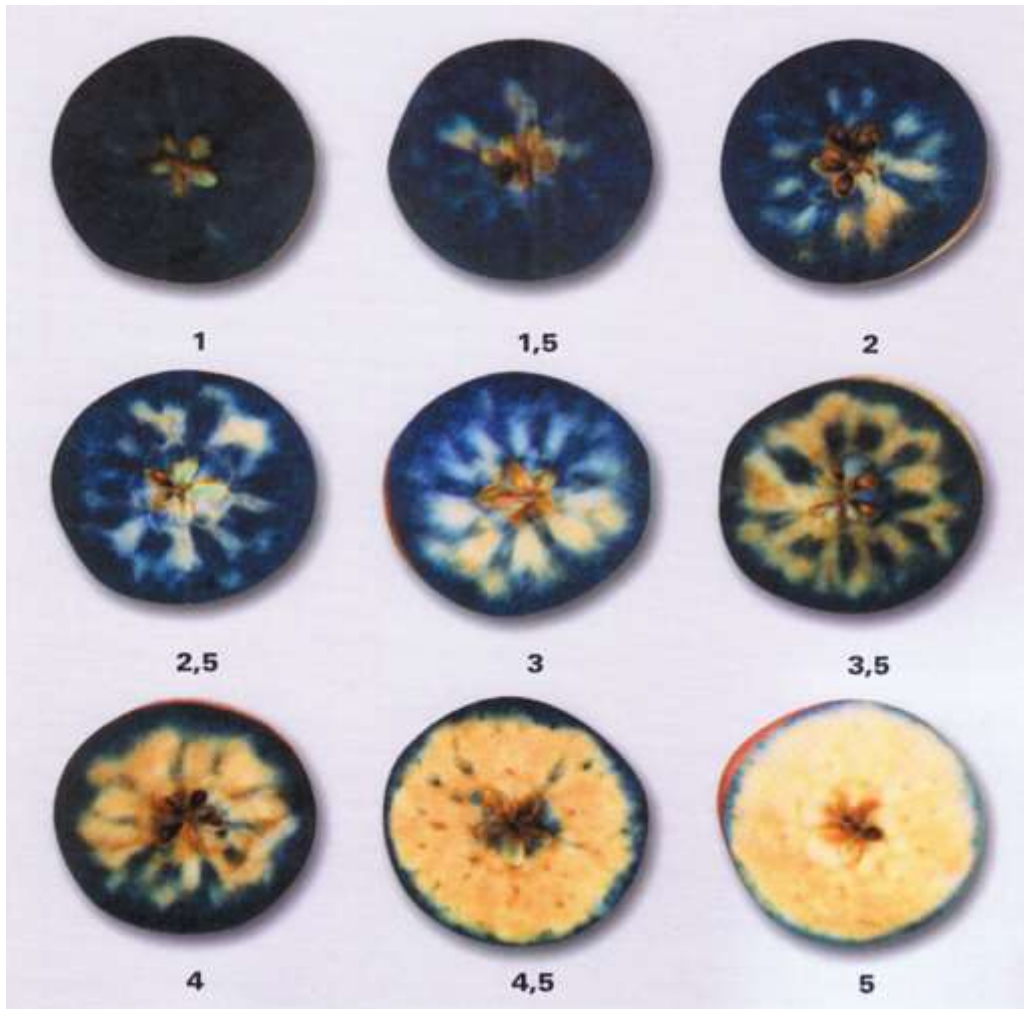


Figura 1 - Sequência de fatias de maçã com diferentes graus de maturação expressos em termos de amido (GIRARD et al., 2002).

1.4 CROMATOGRAFIA GASOSA

As técnicas analíticas frequentemente utilizadas para determinar os perfis aromáticos de fruta são técnicas cromatográficas em fase gasosa (ABRODO et al., 2010).

A cromatografia gasosa é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. O uso acentuado da cromatografia gasosa se deve aos baixos limites de detecção que podem ser conseguidos. Dependendo do tipo de substância analisada e do detector empregado, consegue-se detectar cerca de 10^{-12} g ou até menos. Essa característica faz que haja necessidade de apenas um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas. Vale salientar ainda que a cromatografia gasosa é excelente como técnica quantitativa, sendo possível a obtenção de

resultados quantitativos em concentrações que variam de picogramas a miligramas (BONATO, 2006).

As técnicas baseadas em concentração por *headspace* consistem na pré-concentração da fase de vapor liberada a partir de amostras sólidas ou líquidas, e têm sido aplicadas a muitas matrizes e compostos voláteis. Estes métodos não são destrutivos, evitam a utilização de solventes, permitem o isolamento de compostos voláteis congêneres na sua forma natural e apresentam um mínimo de preparação da amostra (MADRERA et al., 2005).

1.5 ANÁLISE MULTIVARIADA

A estatística multivariada aplicada à química é freqüentemente utilizada no tratamento de dados analíticos. Essa área da quimiometria desenvolve ferramentas computacionais que permitem explorar os resultados obtidos por meio de análises químicas, a fim de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química. O reconhecimento de padrões, uma das principais vertentes do uso da estatística multivariada em química analítica, viabiliza a obtenção de mais informações quando comparado com os procedimentos univariados que são usualmente adotados (CORREIA; FERREIRA, 2007).

O número de parâmetros analisados (variáveis) nos estudos de reconhecimento de padrões é elevado, e a representação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a interpretação dos resultados. Alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Entre eles, destacam-se a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA) (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Análise de Componentes Principais (PCA) envolve um procedimento matemático que identifica padrões de dados e expressando-os de tal modo a realçar semelhanças e diferenças. Uma vez que pode ser difícil de encontrar padrões nos resultados em um conjunto de elevada dimensão, onde representação gráfica não está disponível, o PCA é uma ferramenta poderosa e adequada para a análise de resultados. A outra vantagem principal do PCA é que depois de ter conseguido a padronização dos dados é possível comprimi-los, reduzindo o número de dimensões, sem muita perda de informações (SHAW, 2003).

Análise de agrupamento hierárquico (HCA) é uma forma preliminar para estudar conjuntos de dados na busca de agrupamentos naturais entre as amostras caracterizadas pelos valores de um conjunto de recursos medidos. Devido ao seu caráter não supervisionado, HCA

é uma técnica de reconhecimento de padrões que podem ser utilizados para revelar a estrutura residente num conjunto de dados (GRANATO et al., 2010).

A aplicação de técnicas quimiométricas a dados de GC tem sido investigada como um meio de diferenciar amostras de alimentos com base em vários critérios. A viabilidade da aplicação de GC com quimiometria para a detecção de um tratamento térmico em sucos de maçã foi estudada por Reid et al. (2004). Abrodo et al. (2010) verificaram o papel desempenhado por alguns compostos voláteis na discriminação entre variedades de maçã sidra pertencentes às categorias doces e ácida por análise de componentes principais (PCA), análise discriminante linear (LDA) e análise Bayseian. Madrera e colaboradores (2010) verificaram a influência da maturação de sidra na qualidade aromática de destilados de maçã associando nível de maturação e atributos sensoriais por PCA. Análise de dados quimiométricos foi aplicada para analisar as relações de componentes de aroma de sidra com base nos efeitos de tratamento (CROOK; BOYLSTON, 2004) e para identificar os produtos voláteis de leveduras vitivinícolas que melhor discriminaram entre os tratamentos de fermentação (VILANOVA et al, 2007.).

Diferentes variedades de morango foram analisadas por CG-SPME e os dados de cromatografia foram submetidos à análise estatística. Esta análise permitiu a classificação e discriminação das cultivares baseada nas diferenças de aromas. A adulteração de purê de morango com purê de maçã tem sido investigada pelo uso de CG-SPME com análise de componentes principais (PCA) e análise de mínimos quadrados parciais (PLS). Técnicas quimiométricas em conjunto com CG-SPME também tem sido aplicadas para diferenciação em estudos com whisky, café, óleo vegetal e mel (REID et al., 2004).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALVEIT, M. E. Ethylene. In: **Plant Biology**. Academic Press, Londres, RU. p. 414. 1991.

ABPM. Associação Brasileira de Produtores de Maçã. **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/>> Acesso em: 10 fev, 2011.

ABRODO, P. A., LLORENTE, D. D.; CORUJEDO, S. J.; DE LA FUENTE, E. D.; ÁLVAREZ, M. D. G.; GOMIS, D. B. Characterisation of Asturian cider apples on the basis of their aromatic profile by high-speed gás chromatography and solid-phase microextraction. **Food Chemistry**, v. 121, p. 1312-1318, 2010. 1312-1318.

BALDWIN, E. Fruit flavour, volatile metabolism and consumer perceptions. **Fruit Quality and its Biological Basis**. CRC. Boca Raton, FL, EEUU. p. 89-106, 2002.

BARATA, A.; CAMPO, E.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Analytical and sensorial characterization of the aroma of wines produced with sour rotten grapes using GC-O and GC-MS: identification of key aroma compounds, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2543–2553, 2011.

BEECH, F. W. Cider making and cider research. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 6, p. 259-270, 1993.

BONATO, P. S. Cromatografia Gasosa. In: COLLINS, C. H; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. cap. 8. p. 203-272.

BRASIL. Decreto nº 6871 de 04 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº 8918 de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 jun. 2009.

BROWN, D. S.; BUCHANAN, J. R.; HICKS, J. R. Volatiles from apple fruits as related to variety, maturity, and ripeness. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v. 88, p. 98-104. 1966.

CHIQUELTO, N. C. **Avaliação do processo biotecnológico e determinação das condições de desalcoolização da bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã**. Curitiba, 2004. 107 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Paraná.

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

CROOK, L. R.; BOYLSTON, T. D. Flavor characteristics of irradiated apple cider during storage: Effect of packaging materials and sorbate addition, **Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 7, p. 557-563, ago. 2004

CROUZET, J.; NICOLAS, M.; Molina I.; Valentin, G. Enzymes occurring in the formation of six-carbon aldehydes and alcohols in grapes. **Progress in Flavour Research. Elsevier**. Amsterdam, Holanda. p. 401-408, 1984.

CUNNIGHAM, D. G.; ACREE, T. E.; BARNARD, J.; BUTTS, R.; BRAELL, P. Charm analysis of apple volatiles. **Food Chemistry**, v. 19, p. 137-147. 1986.

De POOTER, H. L.; VAN ACKER, M.; SCHAMP, N. M. Aldehyde metabolism and the aroma quality of stored Golden Delicious apples. **Phytochemistry**, v. 26, p. 89-92. 1987.

DIRINCK, P. J.; SCHAMP, N. Instrumental aroma analysis for objective evaluation of parameters influencing aroma formation in apples and for prediction of the optimum picking date. **Acta Horticultural**, v. 258, p. 421–428. 1989.

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

Dos SANTOS, C. M. E. **Influência da microbiota no perfil aromático de fermentado de maçã**. 2011, 118f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

DÜRR, P.; SCHOBINGER, U. The contribution of some volatiles to the sensory quality of apple and orange juice odour. **Flavour**, New York, 1981.

ECHEVERRÍA, G.; GRAELL, J.; LÓPEZ, M. L.; LARA, I. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of ‘Fuji’ apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, p. 217-227. 2004.

FAN W.; XU Y.; HAN Y. Quantification of volatile compounds in Chinese ciders by stir bar sorptive extraction (SBSE) and gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 1, p. 61-66, 2011.

FELLMAN, J. K.; MILLER, T. W.; MATTINSON, D. S.; MATTHEIS, J. P. Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. **HortScience**, v. 35, p. 1026-1033. 2000.

FELLMAN, J. K.; RUDELL, D. R.; MATTISON, D. S.; MATTHEIS, J. P. Relationship of harvest maturity to flavor regeneration after CA storage of “Delicious” apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 27, p. 39-51. 2003.

FORNEY, C. F.; MATTHEIS, J. P.; BALDWIN, A. E. Effects on flavor. **Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities**. Boca Ratón, FL, EEUU. p.119-159. 2009.

FORSYTH, F. R.; WEBSTER, D. H. Volatiles from McIntosh apple fruits as affected by phosphorus and potassium nutrition. **Journal of American Society Horticultural Science**, v. 96, p. 259-263. 1971.

FRAILE, P.; GARRIDO, J. ANCÍN, C. Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of rose wines. Evolution during fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1789-1798, 2000.

GARRUTI, D. S. **Composição de voláteis e qualidade de aroma do vinho de caju**. Campinas, 2001. 218 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

GIRARDI, C. L.; SANHUEZA, R. M. V.; BENDER, R. J. Manejo pós-colheita e rastreabilidade na produção integrada de maçãs. **Circular Técnica: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. 31, p. 1-23.

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

HANSEN, K.; POLL, L.; OLSEN, C. E.; LEWIS, M. J. The influence of oxygen concentration in storage atmospheres on the post-storage volatile ester production of 'Jonagold' apples. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 25, p. 457-461. 1992.

HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ M. Volatile compounds in cider: Inoculation time and fermentation temperature effects. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 3, p. 210-214, 2006.

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

KAYS, S. J.; PAULL, R. E. Postharvest Biology and Technology. **Exon Press**, Athens, p. 188-195, 2004.

KE, D.; YAHIA, E. M.; MATEOS, M.; KADER, A. A. Ethanolic fermentation of 'Bartlett' pears as influenced by ripening stage and atmospheric composition. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, p. 976-982. 1994.

LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J.-F. Cider making. In: PIGGOTT, J. R. (Ed.). **Fermented Beverage Production**. Londres: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. p. 59-87.

LIN, S.; WALSH, C. S. Studies of the "tree factor" and its role in the maturation and ripening of 'Gala' and 'Fuji' apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 99-106, 2008.

LLORENTE, D. D.; ABRODO, P. A.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; DE LE FUENTE, E. D.; ALONSO, J. J. M.; ÁLVAREZ, M. D. G.; GOMIS, D. B. A new analytical method to volatile compounds in cider apples: Application to evaluate the starch index. **Food Bioprocess Technology**, maio 2012 doi: 10.1007/s11947-012-0879-5

LURIE, S. Postharvest heat treatments of horticultural crops. **Horticultural Reviews**, v.22, p. 91-121. 1998.

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

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

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

MARQUES, D. B.; PASTORE, G. M. Produção de Aromas Naturais por Microrganismos. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 80-85, jan./jun. 1999.

MATTHEIS, J. P., BUCHANAN, D. A., FELLMANN, J. K. Volatile compound production by Bisbee Delicious apples after sequential atmosphere storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 194-199. 1995.

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

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

NOGUEIRA, A.; SWIECH, B. P.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Características físico-químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado e fermentado. **Publicatio. UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 12, n. 3, p. 15-23, dez. 2006.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas Alcoólicas - Ciência e Tecnologia**. 1 ed. São Paulo: Blucher, v. 1, p. 113-142. 2010.

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

PAILLARD, N. M. M. Factors influencing flavor formation in fruits. En Schreier P (Ed.) **Flavour 81**. Gruyter, Berlín, Alemanha, p. 419- 507. 1981.

PENG, B.; YUE, T.; YUAN, Y. Analysis of key aroma components in cider from Shaanxi (China) *Fuji* apple. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 610-615, 2009.

PÉREZ, A. G.; SANZ, C. Formation of fruit flavor. En Bruckner B, Grant WS (Eds.) **Fruit and Vegetable Flavour**. Cambridge, RU. p. 41-70. 2008.

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**.

PINHEIRO, D. M.; PASTORE, G. M. Produção biotecnológica de compostos de aromas. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. p. 195-206.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. **Food Chemistry**, v. 101, p. 845-872, 2007.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; KELLY, J. D.; DOWNEY, G. Preliminary studies for the differentiation of apple juice samples by chemometric analysis of solid-phase microextraction-gas chromatographic data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6891-6896, 2004.

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

SALAZAR, N. S.; OROZCO, G. O. El aroma de la manzana. **Interciencia**, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México, v. 36, n. 4, p. 265-271. 2011.

SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. Biochemistry of Fruit Ripening. Chapman and Hall, London, p. 454. 1993.

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

SIMÕES, D. R. S. **Abordagem tecnológica e sensorial nos produtos de maçã: suco, fermentado e sidra**. 2008, 174f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SISLER, E. C.; DUPILLE, E.; SEREK, M. Effect of 1-methylcyclopropane and amethylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 18, p. 79-86. 1996.

SPEIRS, J.; LEE, E.; HOLT, K.; YONG-DUK, K., STEELE SCOTT, N.; LOVEYS, B.; SCHUCH, W. Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1047–1058. 1998.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. **Applied microbial and cell physiology**, v. 77, p. 145–157, 2007.

WILLIAMS, A. A.; TUCKNOTT, O. G. The volatile aroma components of fermented ciders: minor neutral components from the fermentation of sweet *coppin* apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 381-397.

WILLS, R. B. H.; LEE, T. H.; GRAHAM, D.; McGLASSON, W. B.; HALL, E. G. **Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables**. 4a ed. New South Wales University Press., Australia, p. 174. 1997.

WONG, D. W. S. Flavor. In: **Química de los alimentos: mecanismos y teoría**. España. Acirbia, 1995. p. 259-294.

WYLLIE, S.; FELLMAN, J. K. Formation of volatile branched chain esters in bananas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3493-3496. 2000.

XIABO, Z.; JIEWEN, Z. Comparative analyses of apple aroma by a tin-oxide gas sensor array device and GC/MS. **Food Chemistry**, v. 107, p. 120-128, 2008.

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

YAHIA, E. M. Apple flavor. **Horticultural Reviews**, v. 16: p. 197-234. 1994.

CAPÍTULO II: Classificação de sucos e fermentados de maçã, por perfil aromático, elaborados com frutas verdes, maduras e senescentes através de análise multivariada.

CLASSIFICATION OF JUICES AND FERMENTED BEVERAGES MADE FROM UNRIPE, RIPE AND SENESCENT APPLES BASED ON THE AROMATIC PROFILE USING CHEMOMETRICS

ABSTRACT

The aim of this study was to assess differences between apple juices and fermented apple beverages elaborated with fruits from different varieties and at different ripening stages in the aroma profile by using chemometrics. Ripening influenced the aroma composition of the apple juice and fermented apple. For all varieties, senescent fruits provided more aromatic fermented apple beverages. However, no significant difference was noticed in samples made of senescent or ripe fruits of the *Lisgala* variety. Regarding the juices, ripe *Gala* apple had the highest total aroma concentration. Ethanal was the major compound identified in all the samples, with values between 11.83 mg/L (unripe *Lisgala* juice) and 81.05 mg/L (ripe *Gala* juice). 3-methyl-1-butanol was the major compound identified in the fermented juices. Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were applied and classified the juices and fermented juices based on physicochemical and aroma profile, demonstrating their applicability as tools to monitor the quality of apple-based products.

Keywords: cider, volatile compounds, gas chromatography, multivariate techniques.

1. Introduction

Apples are widely consumed worldwide, not only because of their good storage and manufacturing properties, but also because they present a unique flavour characteristic. In this sense, the most abundant volatile constituents in apples that are associated with the intrinsic aroma are esters (78–92% of total volatiles), alcohols (6–16% of total volatiles), aldehydes, ketones, and ethers (Rita, Zanda, Daina & Dalija, 2011). Nowadays, the aroma of food products, including fruits, has become an important quality parameter for consumers.

Aroma compounds have been studied by several research groups, principally those present in different apple cultivars (Crook & Boylston, 2004; Abrodo, Llorente, Corujedo, De La Fuente, Álvarez & Gomis, 2010; Llorente et al., 2012), non-alcoholic apple beverages (Valappil, Fan, Zhang, & Rouseff, 2009) and alcoholic apple beverages (Madrera, Lobo & Alonso, 2010; Pietrowski, Dos Santos, Sauer, Wosiacki, & Nogueira, 2012; Herrero, García & Díaz, 2006; Madrera, García, Hevia & Valles, 2005; Peng, Yue & Yuan, 2009). Indeed, the analysis of the volatile aroma constituents of food and beverages is one of the main parameters to be assessed when a new product is developed because of their influence on the final sensory properties. The study of these compounds has provided reliable information about distinct stages in the manufacturing process, such as the raw material used and the fermentation process (Madrera et al., 2005).

Cider refers to fermented beverages obtained totally or partly from apples, in other words it is a fermented apple juice product. Aroma compounds are an important indicator of quality and they identify alcohol in cider and other beverages (Fan, Xu & Han, 2011; Pietrowski et al., 2012).

According to Peng et al. (2009), the aroma of cider has an extremely complex chemical pattern, in both qualitative and quantitative terms. The most important compounds

that contribute to the aroma in apple ciders are 2-phenylethanol, butanoic acid, octanoic acid, 2-methylbutanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, 4-ethylguaiacol, eugenol, and 4-vinylphenol (Xu, Fan & Qian, 2007). Fan et al. (2011) also found the compounds ethyl butanoate, ethyl hexanoate, 2-phenylethanol, octanoic acid and isoeugenol to be important compounds.

The application of chemometric techniques coupled with GC data has been investigated as a means of differentiating food samples on the basis of several physicochemical, chemical and sensory parameters. Abrodo et al. (2010) ascertained the role played by some volatile compounds in the discrimination between cider apple varieties by principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA) and Bayesian analysis. Madrera et al. (2010) assessed the influence of cider maturation in the odour quality of cider distillates, associating maturation level and sensorial attributes by PCA. Chemometric data analysis was also applied to examine relationships in apple cider flavour components based on treatment effects (Crook & Boylston, 2004).

It is widely known that the production of aroma compounds is highly influenced by several different factors such as environment, apple variety, ripeness, fermentation condition, yeast strain, the production process and aging (Peng et al., 2009). Fruit ripening is an irreversible process in which many changes develop, firmness and acidity decrease, sugar increases, and starch hydrolysis occurs; therefore the production of aroma is also influenced (Llorente et al., 2012).

A better understanding of the ripening influence in aroma components could improve both cider processing techniques and final product quality. Thus, the aim of this study was to determine differences between apple juices and fermented apple elaborated with fruits from different cultivars (*Fuji Suprema*, *Lisgala* and *Gala*) and ripening stages (unripe, ripe and senescent) in the aroma profile using a chemometric approach.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Samples of *Fuji Suprema* and *Lisgala* apples, 2011/2012 harvest, were collected at the Caçador-SC Experimental Station of the Agricultural and Rural Extension Company, Santa Catarina (EPAGRI) in three different ripening stages (unripe, ripe and senescent), with about 20 kg of samples for each stage and each variety. The apples from the same cultivar were collected at different cardinal points from six different trees. The *Gala* cultivar was collected at Boutin Agrícola in Porto Amazonas, Paraná, using the same procedures. The maturation index was determined by using the Starch-iodine test (Llorente et al., 2012)

The microorganism used to ferment the apple juices was *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet (AEB Group). The chemical standards used in the GC analysis were ethanal, ethyl propanoate, ethyl 3-methyl butanoate, propyl ethanoate, 2-methylpropyl ethanoate, ethyl butanoate, hexanone, 2-heptanone, 2-methyl-1-butanol, 2-hexanol, 2-octanone, ethyl hexanoate, purchased from Interchim (Montluçon, France), ethyl ethanoate, butyl ethanoate, 3-methylbutyl ethanoate, hexyl ethanoate, 2-hydroxy ethyl propanoate, 1-hexanol, ethyl octanoate, ethyl decanoate, butanoic acid, diethyl butanedioate, 2-phenyl-ethanol, ethyl dodecanoate, octanoic acid, all acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and 3-methyl-1-butanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sucrose, D-glucose, D-sorbitol, and ethanol, which had a purity exceeding 99.0%, were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) and D-fructose was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Processing

2.2.1. Processing of apple juice

The fruits were selected and cleaned and then fragmented in a microprocessor (Metvisa, Brusque SC, Brazil). The grated mass was wrapped in shredded plastic screens that overlapped, and was subjected to a pressure of 3 kgf/cm² for 5 minutes (Eureka Hydraulic press, Hoppe Ind. Ltd., Brazil). The juice was treated with pectinase (Pectinex[®] Ultra Clear, Novozymes, Brazil) at a rate of 3 mL/hL (25 °C, 2 h) (Alberti, Vieira, Drilleau, Wosiacki & Nogueira, 2011).

2.2.2. Processing of fermented apple beverage

The depectinised apple must (450 mL) was placed in five fermenters, which consisted of Erlenmeyer flasks (500 mL) capped with a rubber and a needle that allowed the carbon dioxide to be released in a bottle containing potassium of metabisulfite solution. The *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet yeast, in active dried form, was re-hydrated and inoculated according to the manufacturer's specifications. On the twelfth day, the fermentation was stopped and the fermented apple was centrifuged at 10,200 g at 5° C (Hitachi Himac CR21GII centrifuge, Chyoda City, Tokyo, Japan) for 20 minutes and was then racked, bottled and stored at low temperature (-18 °C) until further analysis.

2.3. Instrumental analysis

2.3.1. Collection of volatile compounds – Headspace

Samples (6 mL) of fermented apple beverage were placed in glass vials with a capacity of 20 mL. Then, 50 µL of internal standard (heptanoic acid) was added. The volatile

compounds were identified by comparison between the experimental retention time and the retention time of the chemical standards. Prior to analysis, the samples remained 10 min at 60 °C under agitation in the oven of the automatic injector (Young Lin Instrument gas chromatograph, Anyang, Korea) for 10 minutes (Pietrowski et al., 2012).

2.3.2. Chromatographic analysis of volatile compounds

The analysis of aromatic compounds was performed by gas chromatography (GC): (Young Lin Instrument - YL 6100 GC, Anyang, Korea) equipped with FID, capillary (30 m x 25 mm, 0.25µm thick ZB-WAX film) column (Phenomenex), flame ionisation detector. The injector temperature was 220 °C and the detector temperature was 230 °C. The carrier gas was nitrogen, with a flow of 2.5 mL/min, and the injection technique was split 1:1.2. The analysis conditions were programmed with an initial temperature of 40 °C for 5 minutes with an increase of 10 °C/min to 150 °C, keeping this temperature for 10 minutes. Temperature was then increased by 10 °C/min to 200 °C for 5 minutes and again increased by 10 °C/min to 220 °C, where it remained for 16 minutes. The GC automatic injection method was used with a volume of 1500 µL (Pietrowski et al., 2012).

The composition of the reference stock solution used for the identification and quantification of volatile compounds in the fermented apple beverage was: ethyl ethanoate (133.8 mg/100mL), 2-methylpropyl ethanoate (35.1 mg/100mL), ethyl propanoate (41.5 mg/100mL), ethyl 3-methylbutanoate (34.2 mg/100mL), ethyl butanoate (8.1 mg/100mL), ethyl hexanoate (42.7 mg/100mL), propyl ethanoate (45.6 mg/100mL), butyl ethanoate (5.3 mg/100mL), 3-methylbutyl ethanoate 31.8 mg/100mL), hexyl ethanoate (9.0 mg/100mL), 2-hydroxy ethyl propanoate (130.9 mg/100mL), ethyl octanoate (16.5 mg/100mL), ethyl decanoate (8.7 mg/100mL), diethyl butanedioate (10.2 mg/100mL), ethyl dodecanoate (8.1 mg/100mL), ethanal (260mg/100mL), butanoic acid (18.1 mg/100mL), octanoic acid (75.2

mg/100mL), 3-methyl-1-butanol (241.6 mg/100mL), 2-methyl-1-butanol (32.3 mg/100mL), 2-hexanol (18.5 mg/100mL), 1-hexanol (7.6 mg/100mL), 2-phenylethanol (390.5 mg/100mL), hexanone (30.5 mg/100mL), 2-heptanone (30.1 mg/100mL) and 2-octanone (30.6 mg/100mL). The stock standard solution was diluted 25 times in distilled water. The dilutions of stock solution were subjected to the same analysis conditions as described for the samples of fermented apple beverage, including the addition of internal standard (heptanoic acid).

The compounds were identified by comparing retention times with those obtained in the reference solution. Equation 1 was used to quantify the concentrations of identified volatile compounds where, C is the concentration of component (mg/L), A , the concentration of the substance in the reference solution (mg/L), h , the peak area of the substance in the sample, H , the peak area of substance in the reference, I , the peak area of internal standard in the reference, i , the peak area of internal standard in the sample (Pietrowski et al., 2012).

$$C = A (h H^{-1})(I i^{-1})$$

2.3.3 Chromatographic analysis of sugar and alcohol

For the determination of measurement of sugars the method described by Chinnici, Spinabelli, Riponi and Amati, (2005) was used with modifications. The samples of apple juice and fermented apple beverage at different stages of ripeness were diluted 1:10 (v/v) with Ultra Pure water (Milli-Q) and then filtered in 0.22 μ m membrane before analysis. They were then analysed in a chromatographic system Waters 2695 Alliance (Milford, MA, USA) composed of a quaternary pump, degasser, auto injector equipped with a Waters Sugar PakTM 1 (300 x 6.5 i.d.) column and with refraction index detector Waters RI 2414 (Milford, MA, USA). The injection volume was 10 μ L and flow was 0.5 mL/min in isocratic condition with Ultra Pure water (Milli-Q). The column temperature was maintained at 80 °C and the detector at 50 °C.

Detection of the samples was established by comparison of retention times of the standards of reference. The quantification was calculated for calibration curves of sucrose, D-glucose, D-fructose, D-sorbitol and ethanol.

2.4. Physicochemical analysis

Total titratable acidity was expressed as malic acid and g/100 mL, volatile acidity was expressed as acetic acid and g/100 mL, and total nitrogen was determined by the Kjeldhal method (IAL, 2008).

2.5. Statistical analysis

Data were presented as mean $\pm$ pooled standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to detect significant differences between samples from unripe, ripe and senescent raw material from three cultivars for each physicochemical attribute and for total aroma composition. The analysis was performed separately for juices and fermented beverages. When differences were statistically significant, Fischer's test was used to compare the means.

A chemometric approach composed of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA), implemented in the STATISTICA 7.1 software (Stat-Soft Inc., Tulsa, OK, USA), was used to analyse the aroma profile and to try to classify the samples on the basis of the aroma compounds. PCA involves a mathematical procedure that identifies patterns in data, and expresses them in such a way as to highlight similarities and differences. Since patterns in results can be hard to find in a set of high dimension, where the

luxury of graphical representation is not available, PCA is a powerful and suitable tool for analysing results. The other main advantage of PCA is that once you have found these patterns in the data, you may compress them by reducing the number of dimensions, without much loss of information (Granato, Branco, Cruz & Faria, 2011). In the same sense, HCA is a method of studying study datasets in the search for natural groupings among the samples characterised by the values of a set of measured features. Owing to its unsupervised character, HCA is a pattern recognition technique that can be used to reveal the structure residing in a dataset.

In this study, PCA was applied to separate the samples ($n=18$) according to their values of aroma compounds. For this purpose, the results obtained for each parameter were adopted as columns and the juice samples as rows. Eigenvalues higher than 0.5 were adopted to explain the projection of the samples on the factor plane (PC1 vs PC2). Autoscaling was used as a pre-treatment of the results in order to normalise the statistical importance of all the variables. HCA was performed on autoscaled data, and sample similarities were calculated on the basis of the Euclidean distance. The Ward hierarchical agglomerative method was used to establish clusters. A dendrogram for samples and for response variables were built to obtain a two-dimensional projection of the similarity or dissimilarity of the entire set of samples. In order to compare the results within the two clusters grouped by HCA, data were subjected to the Shapiro-Wilk test to check for normality of distribution, followed by the *F*-test to check for homogeneity of variances. The *t*-Student test (normal distribution of results) or Mann-Whitney *U*-test (non-normal distribution of data) were used to highlight differences among clusters. A *p* level below 0.05 was considered to be significant.

3. Results and discussion

The starch-iodine test is based on the principle that when starch which is not converted into sugar during the ripening process comes into contact with an iodine solution it turns blue-black in colour (Llorente et al., 2012). The more intense the colour, the lower the degree of ripeness of the fruit and the iodine value. The iodine values for the fruits were 1.0 for unripe, 3.0 to 3.5 for ripe and 4.5 for senescent, for all cultivars. These data were confirmed by the concentration of sugars in the juices made from these fruits.

Considering the concentration of juice from apples at the senescence stage to be 100% of the sugar content, it was observed that in terms of the unripe *Fuji Suprema*, *Lis Gala* and *Gala* varieties, the apples already had levels of 72, 74 and 62% of sugars, respectively. Thus, it can be seen that most of the sugars are formed during the development of the fruit and that during the maturation period there is an increase due to the transformation of starch into soluble sugars (Wu et al., 2007). According to Zhang, Li and Cheng (2010), the accumulation of sugars occurs throughout the development of the fruit and continues until the time of harvest.

The amounts of sugars certify the degree of maturity of the fruit, since the samples of juice from unripe apples showed less sugar content, whereas with an increase in maturation there is an increase in sugar content and a decrease in the content of acidity of the fermentation, as seen in Table 1.

Unlike senescent apple juice, that showed higher sugar concentrations than 13.0 g/100 mL, the juices made from unripe and ripe fruits are not considered to be made of good enough quality fruits to obtain juices, according to the classification of Drilleau (1991). All the apple juice samples showed high acidity values, above 0.45 g/100 mL. The content of malic acid in

the must of senescent fruits characterises them as sweet and with high acidity (>0.45 g/100 mL) (Nogueira & Wosiacki, 2012).

The samples of apple juice from *Fuji Suprema* and *Gala* were statistically similar regarding acidity for the unripe and senescent stages. Acidity is considered as an essential element in cider and it must be sufficient to give a clean, refreshing impression to the final product (Peng et al., 2009). Regarding acidity, no difference was noticed between fermented samples from unripe and ripe apples for *Fuji Suprema* and *Gala*.

The volatile acidity found in the samples was lower than the apple must volatile acidity of the *Gala* variety evaluated by Wosiacki, Nogueira, Silva, Denardi and Vieira (2008). An increase in volatile acidity for fermented beverages may be verified in Tables 1 and 2. This increase may be due to the synthesis of acetic acid and ethyl acetate by the yeast (Csoma & Sipiczki, 2008).

The nitrogen content of the apple juice decreased with the increasing maturation of the raw material, as can be seen in Table 1. *Gala* presented the highest values of nitrogen for both juice and the fermented apple beverages (Tables 1 and 2). This was probably due to higher levels of nitrogen fertilisation in the orchard. The nitrogen content, which in apples is in the form of amino acids, classified the unripe and senescent *Gala* juice with a high content (>150.00 mg/L), being sufficient for the yeasts until a complete exhaustion of sugars (Alberti et al., 2011). Amino acids are also important in the metabolism of volatile compounds and are often precursors of aroma (Callejón, Tesfaye, Torija, Mas, Troncoso & Morales, 2008). Fermented *Fuji Suprema* and *Lisgala* were statistically similar regarding nitrogen content, however there was difference for senescent fermented *Lisgala*, as can be seen in Table 1.

It is well known that during alcoholic fermentation yeasts produce not only ethanol, but also fusel alcohols from the sugars and amino acids present in the medium. Thus, the initial concentration of these substrates can greatly influence the final product (Madrera et al.,

2010). The alcohol content of the fermented beverages was influenced by the initial sugar content of the apple must, as verified in Tables 1 and 2.

Table 1 - Physicochemical characteristics of Fuji Suprema, Liscala and Gala apple juices at different ripening stages.

Variety	Ripening Stage	Code	Total Sugar, (g/100mL)	Total Acidity, (g/100mL)	Volatile Acidity, (g/100mL)	Total Nitrogen, (mg/L)
Apple juice						
<i>Fuji Suprema</i>	Unripe	UFJ	9.22 ^h	0.841 ^a	0.026 ^{ab}	114.13 ^d
	Ripe	RFJ	11.21 ^f	0.543 ^e	0.019 ^{bc}	106.87 ^e
	Senescent	SFJ	12.72 ^c	0.510 ^f	0.015 ^c	85.08 ^f
<i>Liscala</i>	Unripe	ULJ	9.85 ^g	0.692 ^b	0.030 ^a	86.11 ^f
	Ripe	RLJ	11.75 ^e	0.584 ^c	0.026 ^{ab}	83.00 ^{fg}
	Senescent	SLJ	13.86 ^b	0.569 ^d	0.034 ^a	78.85 ^g
<i>Gala</i>	Unripe	UGJ	9.13 ⁱ	0.845 ^a	0.011 ^c	283.24 ^a
	Ripe	RGJ	12.04 ^d	0.436 ^g	0.011 ^c	141.10 ^c
	Senescent	SGJ	14.78 ^a	0.521 ^f	0.011 ^c	200.24 ^b
PSD			1.91	0.14	0.01	63.34
Apple fermented beverage						
<i>Fuji Suprema</i>	Unripe	UFF	4.27 ^g	0.789 ^f	0.086 ^{cd}	28.01 ^d
	Ripe	RFF	4.80 ^e	0.782 ^f	0.079 ^d	25.94 ^d
	Senescent	SFF	5.52 ^b	0.733 ^b	0.100 ^{bc}	25.94 ^d
<i>Liscala</i>	Unripe	ULF	3.99 ^h	0.670 ^c	0.076 ^d	29.05 ^d
	Ripe	RLF	4.47 ^f	0.759 ^a	0.114 ^{ab}	26.98 ^d
	Senescent	SLF	5.26 ^c	0.447 ^e	0.120 ^a	18.68 ^e
<i>Gala</i>	Unripe	UGF	2.97 ⁱ	0.573 ^g	0.045 ^e	47.73 ^b
	Ripe	RGF	4.84 ^d	0.566 ^g	0.086 ^{cd}	43.58 ^c
	Senescent	SGF	5.92 ^a	0.599 ^d	0.089 ^{cd}	61.21 ^a
PSD			0.85	0.11	0.02	13.28

Note: PSD: pooled standard deviation. Different letters in the same column represent statistically different results (p<0.05).

The aromatic composition (Tables 3 and 4) found in the apple must and in the fermented apple beverage samples obtained in the present study was characterised by the presence of esters, aldehydes, acids, alcohols and ketones, as also found by Pietrowski et al. (2012).

According to Herrero et al. (2006) and Valappil et al. (2009), the main groups of compounds that form the fermentation's bouquet are the acids, alcohols, and esters and, to a lesser extent, aldehydes and ketones. These are mainly produced by yeast metabolism. The volatile composition of apple juice depends on various factors such as variety, maturity, and storage conditions of the fruit used for pressing (Valappil et al., 2009)

Volatile ester compounds were among the major compounds identified in studies of cider by Crook and Boylston (2004) and Fan et al. (2011). Esters are responsible for sweet and fruity odours (Rita et al., 2011). Among esters, one of the most significant compounds that affect flavour in fermented beverages is ethyl ethanoate, produced from acetyl-CoA and ethanol (Herrero, et al., 2006): it can negatively affect wine aroma when levels are over 200 mg/L. A high concentration of ethyl ethanoate is detrimental to sensory quality, as its odour is usually described as glue-like, although at lower concentrations it is perceived as fruity (Madrera et al., 2010).

Ethyl hexanoate imparts fruity notes but was not detected in the apple must and only at low quantities in the apple fermented samples (Tables 2 and 3). This differed from the study by Pietrowski et al. (2012), who did not find this compound in their fermented beverage, probably because it was produced by oxidative yeasts. According to Madrera et al. (2005), it is associated with fermentative processes and the yeast strains involved.

Compounds associated with desirable flavours are butyl ethanoate, 3-methylbutyl ethanoate, hexyl ethanoate and ethyl butanoate (Fan et al., 2011). According to Pietrowski et al. (2012), among the detected compounds, the presence of ethyl ethanoate, ethyl octanoate, 3-methylbutyl ethanoate, 3-methyl-1-butanol, and ethanol contribute to the fruity aroma of fermented apple beverage and wine. These compounds, mixed with ethyl decanoate, hexyl ethanoate, and 2-phenylethylacetate, determine fruity and floral aromas in wines (Rojas, Gil, Piñaga & Manzanares, 2001). On the other hand, Xu et al. (2007) concluded that the most

important compounds that contribute to the aroma of apple ciders were 2-phenylethanol, butanoic acid, octanoic acid, 2-methylbutanoic acid, 2-phenylethyl acetate, ethyl 2-methylbutanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, 4-ethylguaiacol, eugenol, and 4-vinylphenol. Five of these compounds were identified in the present study (Table 3). Fan et al. (2011) found 13 compounds that were also identified in the present study. The volatile compounds of highest concentration in the present study were 3-methyl-1-butanol, ethanal, ethyl ethanoate, 2-hydroxy ethyl propanoate and 2-phenylethanol, as seen in Table 3. Fan et al. (2011) also observed 3-methylbutanol and 2-phenylethanol among the three highest concentrations of compounds and that ethyl ethanoate was the most common ester present in the ciders.

The aroma compound identified in the highest concentration in the apple juice samples was ethanal. In fermented beverage samples, this aldehyde was detected in smaller amounts than by Pietrowski et al. (2012) probably because of the yeast strain. According to Gil, Cabellos, Arroyo and Prodanov (2006), the production of ethanal that is the most important aldehyde in wine production and is commonly known as a byproduct of alcoholic fermentation, can be influenced by the type of yeast strain. At lower concentrations, ethanal contributes fruity notes; however, at high concentrations (>200 mg/L) this compound negatively influences the aroma in the fermented product. Thus, in this study, even when produced by a fermentative strain, it contributed to a fruity aroma in the product. This compound was also identified in the must at high concentrations. According to Valappil et al. (2009), the concentration of aldehydes is essential for the sensory impression of juice odour. For both the juice and the fermented beverage of all cultivars, the concentration of ethanal increased with the maturation of the raw material, as can be seen in Tables 3 and 4.

The detected acids were butanoic and octanoic. The apple juice and fermented apple samples that showed the highest quantities of octanoic acid were made from senescent *Fuji*

Suprema apple. According to Rita et al. (2011), this is a characteristic aroma compound in ciders made from *Fuji* apples.

3-methyl-1-butanol was detected in fermented samples in values between 54.68 mg/L (Ripe *Gala*) and 126.48 mg/L (Ripe *Lisgala*). This result was close to the values found by Romano, Fiore, Paraggio, Caruso and Capece (2003) (40 mg/L for *Hanseniaspora* strain and 250 mg/L for *Saccharomyces* strain). 3-methyl-butanol is derived from leucine and is considered to be the most quantitatively important alcohol in Chinese ciders. This alcohol was the compound identified in the highest concentration in fermented beverages in the present study. This compound was also found in the must (Table 2). According to Rita et al. (2011), it also plays the major role in the quality of apple juice. 1-hexanol is considered to be a characteristic volatile compound of fruits other than apples and it is produced during the enzymatic oxidation process of linoleic acid (Fan et al., 2011). The higher alcohols are quantitatively the major components in cider and probably contribute more to the flavour of cider than to beer, where they are present in much lower amounts (Herrero et al., 2006). The higher alcohols contribute to the aromatic complexity of fermented beverages at concentrations below 300 mg/L, however, when >400 mg/L they may have a negative effect in terms of the aroma of the product (Moreira, Mendes, Pinho, Hogg & Vasconcelos, 2008). Hexyl acetate is a major characteristic apple flavour compound (Crook & Boylston, 2004).

The highest aroma compound values detected in the fermented apple (82%) were higher than those found in the apple must used for the fermentations. The other 18% of samples were probably metabolised by the yeast. Many of the aroma compounds from apples are lost in processing and most of the aroma compounds in cider are synthesised during fermentation (Williams & Tucknott, 1977).

Table 2 - Concentration of volatile compounds of apple juice samples made from Fuji Suprema, Liscala or Gala apple varieties at unripe, ripe and senescent maturation stages^a.

Apple Juice	<i>Fuji Suprema</i>			<i>Liscala</i>			<i>Gala</i>			
Aroma Compounds	UFJ	RFJ	SFJ	ULJ	RLJ	SLJ	UGJ	RGJ	SGJ	PSD^b
Ethyl ethanoate	0.07	0.17	0.60	4.98	0.54	1.69	0.51	12.04	10.09	4.61
2-methylpropyl ethanoate	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.00
Ethyl butanoate	n.d	0.02	n.d	0.04	n.d	0.07	0.18	3.70	1.42	1.27
Ethyl hexanoate	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.03	n.d	0.01
Butyl ethanoate	0.24	0.26	0.19	0.22	0.22	0.04	0.16	0.15	0.09	0.08
3-methylbutyl ethanoate	0.03	0.09	0.30	0.04	0.07	0.37	0.02	0.18	0.15	0.13
Hexyl ethanoate	n.d	n.d	n.d	0.02	0.08	0.22	0.01	0.12	0.06	0.07
2-hydroxy ethyl propanoate	9.22	6.98	11.25	3.83	14.64	22.46	9.23	37.68	24.97	10.63
Ethyl octanoate	0.02	n.d	0.01	0.01	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.01
Ethyl decanoate	0.02	0.01	n.d	0.01	n.d	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Diethyl butanedioate	2.79	2.39	5.36	2.89	2.62	4.26	3.57	0.70	2.81	1.40
Ethyl dodecanoate	4.87	4.92	4.21	3.85	1.74	4.47	3.20	2.71	2.85	1.96
Ethanal	16.80	17.76	19.63	11.83	14.36	20.33	18.11	81.05	76.97	26.72
Butanoic acid	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	4.21	0.78	0.62	0.70	1.32
Octanoic acid	0.47	0.89	3.26	1.47	1.29	n.d	n.d	1.38	0.60	0.97
3-methyl-1-butanol	1.02	6.25	7.27	1.93	3.07	4.04	0.66	3.12	1.56	2.26
1-hexanol	0.55	0.00	0.60	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25
2-hexanol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.03	n.d	n.d	n.d	0.00
2-phenylethanol	n.d	n.d	n.d	4.15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1.34
Hexanone	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1.67	1.22	0.63
2-heptanone	0.02	0.03	0.02	0.06	0.02	0.07	0.04	0.08	0.07	0.02
2-octanone	n.d	n.d	n.d	0.01	n.d	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01

^aConcentration of volatile compounds identified in mg/L. n.d, not detected. Data are the average of two replicates. ^b PSD, pooled standard deviation.

See Table 1 for the definition of sample abbreviations.

Table 3 - Concentration of volatile compounds of fermented apple made of Fuji Suprema, Liscala or Gala apple varieties at unripe, ripe and senescent maturation stages^a.

Fermented Apple Beverages	<i>Fuji Suprema</i>			<i>Liscala</i>			<i>Gala</i>			
Aroma Compounds	UFF	RFF	SFF	ULF	RLF	SLF	UGF	RGF	SGF	PSD^b
Ethyl ethanoate	30.28	31.45	28.01	27.87	30.82	24.24	34.48	31.31	48.32	9.16
2-methylpropyl ethanoate	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.60	n.d	0.20
Ethyl butanoate	0.26	0.10	0.43	0.05	0.07	0.04	0.05	0.25	0.85	0.28
Ethyl hexanoate	n.d	0.01	0.09	n.d	n.d	n.d	0.10	n.d	0.02	0.04
Butyl ethanoate	n.d	n.d	0.01	n.d	0.03	0.11	n.d	0.19	0.19	0.08
3-methylbutyl ethanoate	1.69	1.69	0.66	0.30	1.06	0.53	1.86	2.79	3.47	1.11
Hexyl ethanoate	0.08	0.29	0.04	0.12	0.16	0.12	0.12	0.41	0.31	0.13
2-hydroxy ethyl propanoate	11.27	22.08	20.51	18.70	25.60	21.65	13.33	38.04	16.63	7.85

Ethyl octanoate	0.55	0.47	0.25	0.14	0.23	0.31	0.85	1.08	1.59	0.48
Ethyl decanoate	0.65	0.79	0.33	0.09	0.20	0.42	0.50	1.17	0.89	0.35
Diethyl butanedioate	3.51	3.51	3.19	2.37	2.56	3.24	2.26	2.74	2.05	0.76
Ethyl dodecanoate	4.51	4.17	5.05	5.11	4.60	3.33	4.23	3.66	4.16	1.98
Ethanal	71.86	73.78	151.23	40.77	101.58	131.55	47.23	55.67	159.14	44.03
Butanoic acid	1.27	3.03	8.10	n.d	n.d	n.d	3.35	4.39	9.20	3.36
Octanoic acid	3.87	7.32	21.51	5.17	5.19	3.86	5.71	4.09	5.30	5.42
3-methyl-1-butanol	114.66	118.79	122.74	109.32	126.48	98.66	68.32	54.68	119.41	26.79
1-hexanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.34	0.00	0.11
2-hexanol	3.18	5.36	4.87	2.12	2.63	3.23	2.84	25.36	5.47	7.19
2-phenylethanol	15.55	15.71	20.87	17.43	16.58	10.34	8.98	33.80	20.84	7.06
Hexanone	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0.03	7.17	2.33
2-heptanone	0.03	0.04	0.04	0.00	0.13	0.00	0.03	0.03	0.03	0.04
2-octanone	0.02	0.07	0.02	0.01	n.d	n.d	0.02	0.11	0.03	0.04

^aConcentration of volatile compounds identified in mg/L. n.d, not detected. Data are the average of two replicates. ^b PSD, pooled standard deviation.

See Table 1 for the definition of sample abbreviations.

From Figure 2A it is clear that when the aim is to produce an aromatic fresh apple juice it is recommended to use ripe fruits of the *Gala* variety and senescent *Lisgala*. Regarding the *Fuji Suprema* variety there was not significant difference. Comparing all samples in Figures 2A and B is possible to affirm that ripening provides an increase in aromatic concentration, except for the *Gala* juice, where the highest concentration was from ripe samples instead of senescent. Consequently, to produce an aromatic fermented apple beverage it is recommended to use senescent fruits from all varieties, however there was no significant difference in the fermented beverages between senescent or ripe fruits of the *Lisgala* variety.

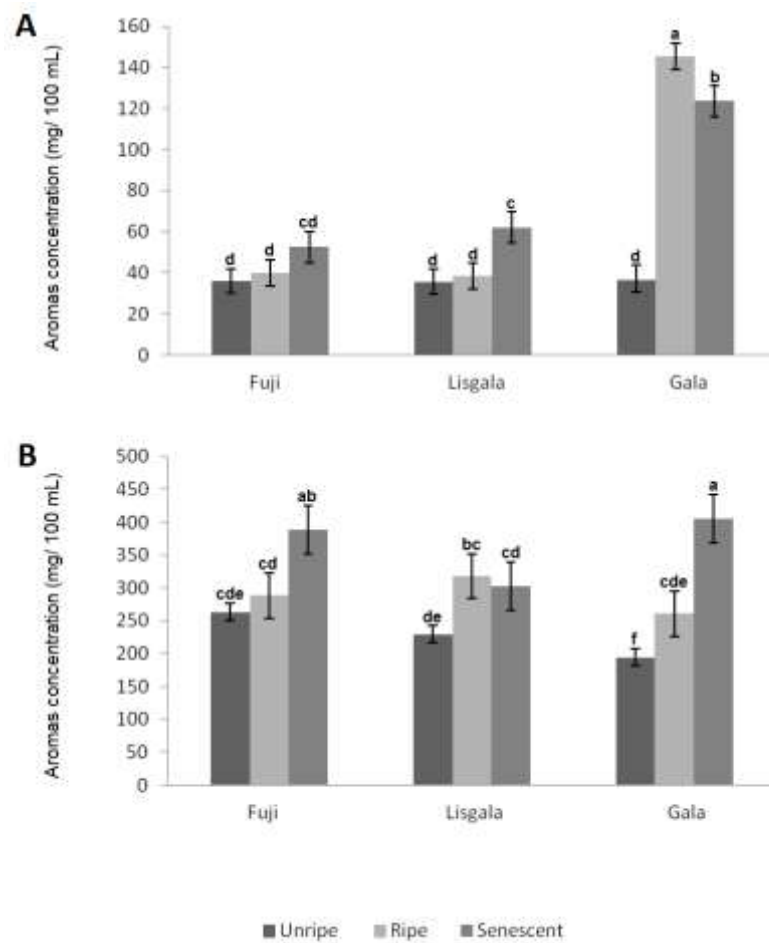


Figure 2 - Bar graphics comparing apple juices (A) and fermented beverage samples (B).

The 21 volatiles were analysed by principal component analysis (PCA) in order to reduce the dimensions and investigate which differences of the apple cultivars could be visualised. Figure 3 shows the scatter plot (PC1 vs. PC2) for the whole set of variables for an analysis with seventeen factors. The results were autoscaled before they were submitted to principal component analysis (PCA). PC1 explained 39.71% of the total variance in the data set while PC2 explained 13.41%, explaining up to 53.12% of the total variance. Figure 3 shows the loading plot, which evidences the variables according to their importance. Samples were separated along the first component (PC) by differences in the content of ethyl ethanoate, butyl ethanoate, 3-methylbutyl ethanoate, hexyl ethanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethanal, butanoic acid, 3-methyl-1-butanol, 2-hexanol, 2 phenylethanol, hexanone

and 2-octanone. The second PC separated the samples on the basis of ethyl butanoate, diethyl butanedioate, 1-hexanol and 2-heptanone concentrations (Fig. 3).

Due to their aroma compounds, shown by their position on PC 1, the beverage samples RGF (Ripe *Gala* Fermented) and SGF (Senescent *Gala* Fermented) were characterised by presenting a sweet aroma with a fruity note, which is similar to that of apple cider aroma. The reverse was observed in the samples of UGJ (Unripe *Gala* Juice), ULJ (Unripe *Lisgala* Juice), UFJ (Unripe *Fuji* Juice), RFJ (Ripe *Fuji* Juice), RLJ (Ripe *Lisgala* Juice) and SFJ (Senescent *Fuji* Juice) because of their opposite position on PC 1. On the other hand, there was a high concentration of butyl ethanoate in these samples which gives a desirable flavour. The same was noticed in RGJ (Ripe *Gala* Juice), which had a high concentration of ethyl butanoate due to its position on PC 2.

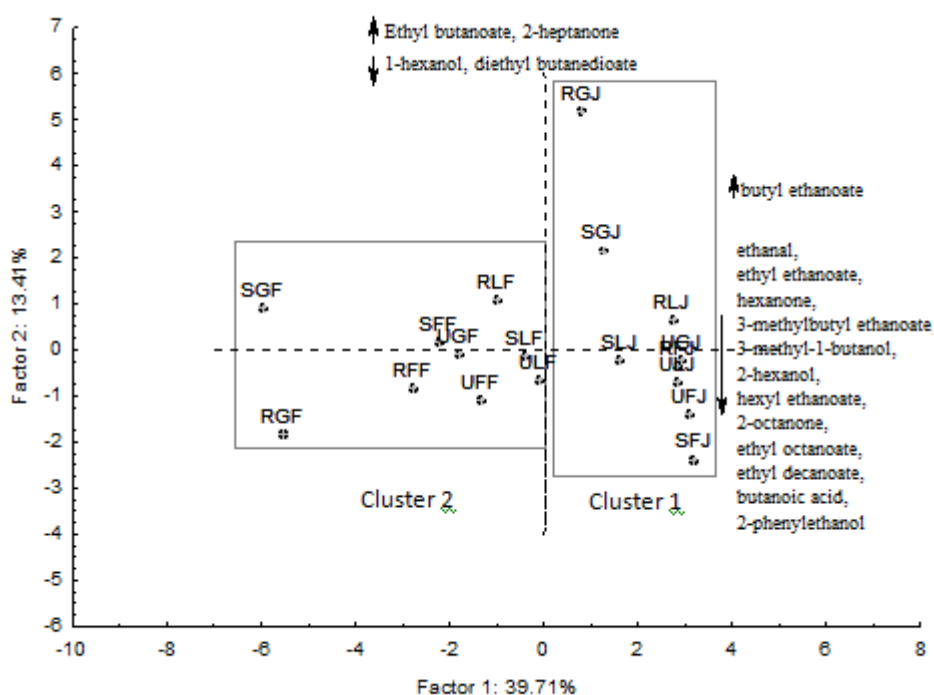


Figure 3 - A scatter plot of PC 1 vs. PC 2 of the main sources of variability between the apple juice and fermented apple samples. See Table 1 for the definition of sample abbreviations.

Once two major groups were formed using PCA, the similarity of samples was evaluated using HCA, which corroborated the results obtained by PCA, where samples were clustered in two groups: juice and fermented apple juice (Fig. 3). These results indicate that the aroma compounds evaluated in this study can be suitable markers to differentiate apple juices from fermented apple juices based on the aroma profile. After clustering the samples, the Student-*t* test or Mann-Whitney *U*-test was carried out to compare the means of each evaluated parameter within the two groups and the results are shown in Table 4.

Table 4 shows that the fermented apple juices presented higher concentrations of ethyl ethanoate, 3-methylbutyl ethanoate, hexyl ethanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethanal, octanoic acid, 3-methyl-1-butanol, 2-hexanol and 2 phenylethanol than the concentrations found in the apple juices. The fermented apple beverage samples presented the highest concentration of the principal compounds, which confirms the results shown in Figure 1. On the other hand, there was a higher amount of butyl ethanoate in the apple juices in comparison to the fermented apple beverages. These compounds presented significant differences between the clusters, as can be seen in Table 4.

Table 4 - Aroma compounds of apple juices and fermented apple beverages.

Variables	Cluster 1: Juice (n=9)	Cluster 2: Fermented (n=9)	PSD ^a	P value ^b
Ethyl ethanoate	3.41	31.86	15.69	0.00
Ethyl butanoate	0.60	0.23	0.90	0.23
Ethyl hexanoate	0.00	0.02	0.03	0.23
Butyl ethanoate	0.18	0.06	0.10	0.00
3-methylbutyl ethanoate	0.14	1.56	1.03	0.00
Hexyl ethanoate	0.06	0.18	0.12	0.00
2-hydroxy ethyl propanoate	15.58	20.87	9.56	0.25
Ethyl octanoate	0.00	0.61	0.45	0.00
Ethyl decanoate	0.01	0.56	0.37	0.00
Diethyl butanedioate	3.04	2.82	0.97	0.64
Ethyl dodecanoate	3.65	4.31	0.92	0.17
Ethanal	30.76	92.53	48.25	0.00
Butanoic acid	0.70	3.26	2.87	0.11
Octanoic acid	1.04	6.89	4.92	0.00

3-methyl-1-butanol	3.21	103.67	54.58	0.00
1-hexanol	0.16	0.04	0.20	0.35
2-hexanol	0.00	6.12	5.92	0.00
2-phenylethanol	0.46	17.79	10.25	0.00
Hexanone	0.32	0.80	1.72	1.0
2-heptanone	0.04	0.04	0.03	0.61
2-octanone	0.01	0.03	0.03	0.12

Note: ^a PSD, pooled standard deviation; ^b Probability values obtained by *t*-Student test or Mann-Whitney *U*-test.

4. Conclusion

The ripening stage significantly influenced the chemical and aromatic compositions of apple juice and fermented apple beverage. The highest concentrations of aromatic compounds were found in fermented juices made from senescent apples. In order to produce an aromatic fermented apple beverage it is recommended to use senescent fruits for all varieties, however there was no significant difference between the fermented beverages from senescent or ripe fruits from the *Lisgala* variety. Regarding the juices, ripe *Gala* apple showed a prominence relating to aroma concentration in comparison to other cultivars. When the aim is to produce an aromatic fresh apple juice, the use of ripe fruits from the *Gala* variety and senescent *Lisgala* is recommended. Regarding the *Fuji Suprema* variety, there was not significant difference. The fermented beverage samples presented a desirable flavour marked by a sweet aroma with a fruity note, characteristic of apple cider aroma, due to their aroma compounds. Using a chemometric approach based on unsupervised statistical techniques it was possible to classify apple juices and fermented apple beverages on the basis of aromatic compounds, demonstrating the applicability of multivariate statistical techniques as tools to monitor the quality of apple-based products.

Acknowledgements

The authors are deeply grateful to Federal Technologic University of Paraná (UTFPR-campus Ponta Grossa), EPAGRI - Research Station of Caçador and Agrícola Boutin, for the infrastructure and apple samples and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Araucaria Foundation (FA) and Coordination for the Improvement of Personnel in Higher Level (CAPES) for the scholarships offered during the implementation period of this research.

References

- Abrodo, P. A., Llorente, D. D., Corujedo, S. J., De La Fuente, E. D., Álvarez, M. D. G., & Gomis, D. B. (2010). Characterisation of Asturian cider apples on the basis of their aromatic profile by high-speed gas chromatography and solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 121, 1312-1318.
- Alberti, A., Vieira, R. G., Drilleau, J. F., Wosiacki, G., & Nogueira, A. (2011). Apple wine processing with different nitrogen contents. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 551-558.
- Callejón, R. M., Tesfaye, W., Torija, M. J., Mas, A., Troncoso, A.M., & Morales, M. L. (2008). HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *European Food Research and Technology*, 227, 93–102, 2008.
- Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., & Amati, A. (2005). Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 121-130, 2005.
- Crook, L. R., & Boylston, T. D. (2004). Flavor characteristics of irradiated apple cider during storage: Effect of packaging materials and sorbate addition. *Journal of Food Science C: Food Chemistry and Toxicology*, 69, 557-563.
- Csoma, H., & Sipiczki, M. (2008). Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8, 328–336.
- Drilleau, J.F. Consolider les connaissances et maîtriser la qualité du produit fini. (1991) *Pomme*, 23, 23-25.

Fan W., Xu Y., & Han Y. (2011). Quantification of volatile compounds in Chinese ciders by stir bar sorptive extraction (SBSE) and gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS). *Journal of the Institute of Brewing*, 117, 61-66.

Gil, M., Cabellos, J. M., Arroyo, T., & Prodanov, M. (2006). Characterization of the volatile fraction of young wines from the domination of origin "Vinos de Madrid". *Analytical Chemistry Acta*, 563, 145-153.

Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2011). Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 563-571.

Herrero, M., García, L. A., & Díaz M. (2006). Volatile compounds in cider: Inoculation time and fermentation temperature effects. *Journal of the Institute of Brewing*, 112, 210-214.

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

Llorente, D. D., Abrodo, P. A., González-Álvarez, J., De Le Fuente, E. D., Alonso, J. J. M., Álvarez, M. D. G., & Gomis, D. B. (2012) A new analytical method to volatile compounds in cider apples: Application to evaluate the starch index. *Food Bioprocess Technology*. doi: 10.1007/s11947-012-0879-5

Madrera, R. R., García, N. P., Hevia, A. G., & Valles, B. S. (2005). Application of purge and trap extraction and gas chromatography for determination of minor esters in cider. *Journal of Chromatography A*, 1069, 245-251.

Madrera, R. R., Lobo, A. P., Alonso, J. J. M. (2010). Effect of cider maturation on the chemical and sensory characteristics of fresh cider spirits. *Food Research International*, 43, 70-78.

Moreira, N., Mendes, F., Pinho, P. G., & Hogg, T., Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 231-238.

Nogueira, A., & Wosiacki, G. (2012). Apple cider fermentation. In Y. H. Hui, E. Ö. Evranuz (Eds.), *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology* (pp. 209-235). CRC Press: Boca Raton, FL.

Peng, B., Yue, T., & Yuan, Y. (2009). Analysis of key aroma components in cider from Shaanxi (China) Fuji apple. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 610-615.

Pietrowski, G. A. M., Dos Santos, C. M. E., Sauer, E., Wosiacki, G., & Nogueira, A. (2012). Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9815-9821.

Rita, R., Zanda, K., Daina K., & Dalija S. (2011). Compositions of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. *Procedia Food Science*, 1, 1709-1716.

- Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., & Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-Saccharomyces wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 283-289.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169-180.
- Valappil, Z. A., Fan, X., Zhang, H. Q., & Rouseff, R. L. (2009). Impact of thermal and nonthermal processing technologies on unfermented apple cider aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 924-929.
- Williams, A. A., & Tucknott, O. G. (1977). The volatile aroma components of fermented ciders: minor neutral components from the fermentation of sweet *coppin* apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 381-397.
- Wosiacki, G., Nogueira, A., Silva, N. C. C., Denardi, F., & Vieira, R. G. (2008). Quality profile of samples of 139 apples - cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. *Acta Alimentaria*, 37, 9-22.
- Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chemistry*, 103, 88-93.
- Xu, Y., Fan, W., & Qian, M. C. (2007). Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporations and headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3051-3057.
- Zhang, Y., Li, P., & Cheng, L. (2010). Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. *Food Chemistry*, 123, 1013-1018.