

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA*)  
E PROCESSAMENTO DE SEU SUCO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Kim Ohanna Pimenta Inada

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN) do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Costa Monteiro  
Prof. Dr. Daniel Perrone Moreira

Rio de Janeiro  
Outubro de 2014

Inada, Kim Ohanna Pimenta

Caracterização Química da Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) e Processamento de seu Suco por Alta Pressão Hidrostática / Kim Ohanna Pimenta Inada. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição, 2014.

xviii, 88 f. ; il. ; 31 cm.

Orientador: Mariana Costa Monteiro e Daniel Perrone Moreira.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2014.

Referências bibliográficas: f. 85 – 94.

1. Conservação de Alimentos - métodos. 2. Pressão Hidrostática. 3. Frutas - química. 4. Sucos. 5. Manipulação de Alimentos. 6. Valor Nutritivo. 7. Antioxidantes - análise. 8. Myrtaceae - química. 9. Bebidas - análise. 10. Análise de Componente Principal. 11. Nutrição - Tese. I. Monteiro, Mariana Costa. II. Moreira, Daniel Perrone. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição. IV. Título.

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA*)  
E PROCESSAMENTO DE SEU SUCO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA**

Kim Ohanna Pimenta Inada

**DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA.**

Examinada por:

---

Profª Drª Mariana Costa Monteiro, DSc  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof Dr. Daniel Perrone Moreira, DSc  
Instituto de Química  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Profª Drª Maria Ines Genovese Rodrigues, DSc  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

---

Profª Drª Vera Lúcia Valente Mesquita, DSc  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Profª Drª Ana Luisa Kremer Faller, DSc  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

RIO DE JANEIRO  
OUTUBRO DE 2014

À minha família maravilhosa.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me concedido força e fé para enfrentar os momentos difíceis, além de ter colocado na minha vida pessoas incríveis que me ajudaram do início ao fim.

Aos meus pais, Beth e Miti, que tanto me apoiaram em todas as decisões que tomei ao longo da vida, fazendo de tudo para que eu pudesse alcançar meus sonhos e batalhando junto comigo por cada conquista. Nem gosto de imaginar como seria a minha vida sem as caronas, comidinhas, mimos e surpresas. Eu jamais poderia ter pais melhores.

À minha irmã e grande amiga Haynna, minha enciclopédia ambulante, a pessoa com quem eu sempre posso contar parar rir (especialmente dos outros), comemorar e reclamar da vida. Sempre faz de tudo para atender meus pedidos de socorro e me acalmar nos momentos de desespero. Nossos papos intermináveis antes de dormir me fazem acordar com muito mais sono no dia seguinte, mas sem eles a vida não teria a mesma graça. Sem você, todo esse caminho percorrido seria muito mais difícil.

À minha irmã e grande amiga Poliana, que durante a minha infância e adolescência foi também a minha segunda mãe. Muito obrigada por todo o carinho e amor incondicionais concedidos durante toda a minha vida. A minha defesa de Mestrado é a prova de que rir demais não deixa ninguém (mais) retardado.

Ao meu sobrinho Daniel, que nasceu me fazendo chorar de felicidade e fez despertar em mim uma tia-dinda muito boba e “puxa-saco”. Obrigada pelo carinho, fofura e todas as alegrias que você trouxe para a minha vida. Com você, as minhas dificuldades ficaram muito mais coloridas.

À minha querida tia Sumiê Inada, que nos deixou tão repentina e inesperadamente em uma semana tão difícil para mim (25/08/2014). Um dia, quando eu “crescer”, gostaria de ter a metade de sua bondade e caridade e fazer pelo menos  $\frac{1}{4}$  da diferença que você fez na vida de tantas pessoas.

Ao meu namorado e amigo Thiago, que mediou as 1600 escalas da análise sensorial e ainda tabulou os dados. Você entrou comigo nessa jornada, me deu a mão e não me deixou cair. Seu amor, amizade, apoio e compreensão foram muito importantes para a minha chegada até aqui.

A toda a minha família (principalmente meus tios e padrinhos Valesca e Rogério, minha avó Aparecida, minha prima Luiza, meu tio Márcio e meus cunhados Bruno e Renato) que tanto torceram por mim e vibraram com cada conquista.

À minha orientadora Mariana Monteiro, que apareceu na minha vida em um dos momentos em que eu mais precisava e não sabia o que fazer. Sem me conhecer, me aceitou de braços abertos e me apoiou nas minhas decisões, sempre me colocando para cima. É uma orientadora invejável, do tipo que vai para a bancada para te ensinar, sem se preocupar se vai se sujar e sem medo de bichos nojentos ou das lagartixas do Fundão. Ela ama a pesquisa e a docência e conseguiu aumentar essa paixão em mim. Fico muito feliz pelo fato de que continuarei sendo sua aluna. Sem você, eu jamais teria conseguido. Muito obrigada.

Ao meu orientador Daniel Perrone, muito dedicado, atencioso e paciente, nunca poupou esforços para me ajudar. Você contribuiu imensamente para o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico e sempre acreditou no meu potencial. Espero que a nova etapa seja ainda melhor do que essa que passou. Sem você, eu jamais teria conseguido. Muito obrigada por ter me aceitado como sua aluna.

Às meninas do grupo BIOTA (Andressa, Ellen e Laís), com quem eu aprendi muito e amadureci pessoalmente e profissionalmente. Muito obrigada por toda a amizade e ajuda concedida durante esse tempo.

Às minhas alunas de iniciação científica Tamirys e Ana Beatriz, obrigada pela amizade, interesse e boa vontade em ajudar nas análises da minha dissertação. Trabalhar com vocês tornou tudo mais divertido.

Aos professores Alexandre, Juliana e Vanessa e a todos os alunos do LBNA, especialmente André, Bia, Emília, Fabrício, Genilton, Nívea e Suellen, obrigada por toda ajuda, amizade e companheirismo.

Às minhas grandes amigas, especialmente Marina, Renata, Jenifer, Fabíola, Mabel, Paola e Júlia, que trouxeram luz para a minha vida e tornaram as dificuldades muito menores. Gostaria de falar de cada uma de vocês separadamente, mas eu teria que ter 7 páginas a mais de agradecimentos só para isso.

Às professoras Vera Lúcia e Maria Lúcia, minhas mães científicas, professoras maravilhosas, que me deram a primeira oportunidade de iniciação científica e fizeram com que eu me apaixonasse pela ciência.

À Flávia Dias, minha primeira orientadora na iniciação científica, a qual eu tive a grande honra de ajudar nas suas análises da dissertação de Mestrado.

A todos os membros do LABAFS, especialmente à Chris, que sempre ouviram minhas dificuldades e me acolheram com tanto carinho e bom humor.

Ao professor Ricardo Santelli e seus alunos Aline e Bernardo, muito obrigada pela boa vontade, paciência e rapidez na realização das minhas análises de minerais.

Ao professor Lauro Melo, muito obrigada pela ajuda na escolha do método de análises sensoriais, além das excelentes aulas que tive oportunidade de assistir na sua disciplina.

Aos professores e alunos do DAFFE, que cederam o espaço para que eu realizasse parte das minhas análises.

Resumo da dissertação apresentada ao PPGN/UFRJ como parte dos requisitos necessários  
para a obtenção do grau de mestre em Nutrição Humana

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA*)  
E PROCESSAMENTO DE SEU SUCO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Kim Ohanna Pimenta Inada

Outubro/2014

Orientadores: Mariana Costa Monteiro e Daniel Perrone Moreira

A jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) é uma fruta nativa da Mata Atlântica Brasileira. Embora apresente compostos bioativos e características sensoriais desejáveis, a alta perecibilidade da fruta limita o seu uso comercial. A alta pressão hidrostática é um método de conservação de alimentos não-térmico que preserva as qualidades nutricionais e sensoriais normalmente perdidas durante os processos com temperaturas elevadas. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade antioxidante (ensaios FRAP, TEAC e ORAC), os teores de compostos fenólicos, antocianinas e flavonoides totais por métodos espectrofotométricos, avaliar o perfil de compostos fenólicos, carotenoides e tocoferóis e os teores de ácido ascórbico por cromatografia líquida de alta eficiência, e a composição centesimal e mineral dessa fruta e de suas frações (casca, polpa, semente e resíduo). Além disso, foi investigado o efeito do processamento por alta pressão hidrostática sobre a atividade antioxidante, os teores de compostos fenólicos, a qualidade microbiológica e a aceitação sensorial do suco de jabuticaba. A fruta inteira e as frações casca, semente e resíduo podem ser consideradas fontes de fibras (31,8 a 38,4 %) e apresentaram elevada atividade antioxidante e teores de compostos bioativos. Já a polpa, apresentou elevados teores de potássio, podendo ser considerada fonte de manganês, cobre e ferro. Pela primeira vez na literatura, carotenoides e tocoferóis foram identificados na jabuticaba e os resultados sugerem que a fruta pode ser considerada fonte

moderada de  $\beta$ -caroteno (873,2  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  base seca). A cianidina-3-*O*-glicosídeo foi o composto fenólico encontrado em maior quantidade na casca e no resíduo, enquanto a miricetina foi predominante na semente e na polpa. Os sucos foram tratados em diferentes níveis de pressão (200 e 500 MPa) e tempos de pressurização (5 e 10 minutos), com um ponto central (350 MPa/7,5 minutos). A pressurização por 350 MPa por 7,5 minutos foi capaz de garantir a qualidade microbiológica e preservar os teores de compostos bioativos e a atividade antioxidante do suco, sem diferenças nos atributos de aceitação impressão global, aparência e textura, assim como na intenção de compra. Os resultados encontrados sugerem que a jabuticaba apresenta potencial de comercialização devido à sua elevada qualidade nutricional e de compostos bioativos e destacam a possibilidade de utilização da alta pressão hidrostática na indústria de alimentos como alternativa aos métodos térmicos de conservação.

*Palavras-chave:* compostos fenólicos, atividade antioxidante, carotenoides, vitamina C, planejamento fatorial completo, qualidade microbiológica, aceitação sensorial.

CHEMICAL CHARACTERIZATION OF JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA*)  
AND HIGH HYDROSTATIC PRESSURE PROCESSING ON ITS JUICE

Kim Ohanna Pimenta Inada

October/2014

Advisors: Mariana Costa Monteiro e Daniel Perrone Moreira

Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) is a native fruit of the Brazilian Atlantic Rainforest. Although it has important bioactive compounds and desirable sensory attributes, jabuticaba is highly perishable, limiting its commercial use. High hydrostatic pressure is a non-thermal food processing method which preserves the nutritional and sensory qualities normally lost during heating processes. The present study aimed to determine the antioxidant activity (ORAC, TEAC and FRAP assays) and the contents of total phenolic compounds, total flavonoids and total anthocyanins by spectrophotometric methods, phenolic compounds, carotenoids and tocopherols profile and ascorbic acid contents by high-performance liquid chromatography, the chemical and mineral composition of this fruit and its fractions (peel, pulp, seeds and residue). Furthermore, we investigated the effect of high hydrostatic pressure on the antioxidant activity and phenolic compounds contents, microbiological activity and consumer acceptance of jabuticaba juice. Jabuticaba whole fruit, peel, seed and residue can be considered a source of dietary fibers (31.8 to 38.4%) and presented high antioxidant activity and bioactive compounds. Pulp, however, showed the highest contents of potassium, and can be considered source of manganese, copper and iron. Carotenoids and tocopherols were identified for the first time in jabuticaba and the results suggest that this fruit can be considered a moderate source of  $\beta$ -carotene (873.2  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  dry weight basis). Cyanidin-3-*O*-glucoside was the major phenolic compound in jabuticaba peel and residue, while in jabuticaba seed and pulp myricetin was predominant. Jabuticaba juices were pressurized at

different pressure (200 and 500 MPa) and time conditions (5 and 10 minutes) with a central point (350 MPa for 7.5 minutes). Moderate pressurization conditions (350 MPa for 7.5 min) were adequate to ensure jabuticaba juice microbiological quality while maintaining bioactive compounds contents and antioxidant activity with no differences in overall impression, appearance and texture, as well as purchase intent scores. Our results suggest that jabuticaba presents great commercialization potential due to its high nutritional quality and bioactive compounds contents and highlight the possible application of high hydrostatic pressure in the food industry as an alternative to thermal processing methods.

*Key words:* Phenolic compounds, antioxidant activity, carotenoids, ascorbic acid, full factorial design, microbiological quality, sensory acceptance.

## SUMÁRIO

### Revisão Bibliográfica

1. Jabuticaba ( <i>Myrciaria jaboticaba</i> ).....	20
1.1 Aspectos Botânicos e Cultivo.....	20
1.2 Consumo e comercialização.....	21
1.3 Caracterização química da jabuticaba.....	22
1.4 Potenciais efeitos benéficos da jabuticaba na saúde.....	22
2. Compostos Fenólicos.....	23
2.1 Antocianinas.....	25
3. Métodos de Conservação.....	29
3.1 Alta Pressão Hidrostática (APH).....	30
<b>Justificativa.....</b>	<b>33</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>35</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>37</b>
1. Amostras.....	38
2. Composição centesimal, pH e sólidos solúveis totais.....	38
3. Composição mineral.....	38
3.1 Preparo da Amostra.....	38
3.2 Determinação de macrominerais.....	39
3.3 Determinação de microminerais.....	39
4. Análise de carotenoides e tocoferois determinados por CLAE.....	40
5. Análise de ácido ascórbico determinados por CLAE.....	41
6. Análise de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas monoméricas por métodos espectrofotométricos.....	41
7. Atividade antioxidante.....	42
8. Análise de compostos fenólicos por CLAE-DAD.....	43
9. Processamento por APH.....	45
10. Análises microbiológicas.....	46
11. Análise de aceitação sensorial.....	46
12. Análises estatísticas.....	47

**Capítulo 1: Bioactive compounds and chemical composition of jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*) and its fractions.**

1. Introduction.....	49
2. Material and Methods.....	50
3. Results and Discussion.....	57
4. Conclusion.....	68
5. Acknowledgments.....	68

**Capítulo 2: Effect of high hydrostatic pressure processing on bioactive compounds of jabuticaba juice**

1. Introduction.....	70
2. Material and Methods.....	71
3. Results and Discussion.....	75
4. Conclusion.....	84
5. Acknowledgments.....	84

<b>Referências Bibliográficas.....</b>	85
--	----

<b>Anexos.....</b>	95
--------------------	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Absorbance
AA	Antioxidant activity
AAPH	2,2'-azobis-(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
ABD	Ágar batata dextrose
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
AI	Adequate Intakes
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APC	Ágar padrão para contagem
APH	Alta Pressão Hidrostática
BS	Base seca
CADEG	Central de Abastecimento do Estado da Guanabara
C3G	Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Charge coupled-device detector
CFU	Colony Forming Units
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D3G	Delfnidina-3- <i>O</i> -glicosídeo
DAD	Diode array
DF	Dilution factor
DWB	Dry weight basis
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FWB	Fresh weight basis
GAE	Gallic acid equivalents
HAT	Hydrogen Atom Transfer
HDL	High density lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

HPP	High pressure processing
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
MNP	Most Probable Number
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
MPa	Megapascal
MW	Molecular weight
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PCA	Plate Count Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
PM	Peso Molecular
RDA	Recommended Dietary Allowances
SET	Sigle Electron Transfer
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazine
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
TSS	Total soluble solids
UHT	Ultra high temperature
WHO	World Health Organization
$\epsilon$	Molar extinction coefficient

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

<b>Figura 1.</b>	Jabuticabeira.....	21
<b>Figura 2.</b>	Estrutura básica dos compostos fenólicos.....	23
<b>Tabela 1.</b>	Classe de compostos fenólicos em plantas.....	24
<b>Figura 3.</b>	Agliconas representativas das subclasses dos flavonoides.....	26
<b>Figura 4.</b>	Estrutura básica das principais antocianidinas e grupamentos para formação das diferentes antocianinas encontradas na natureza.....	27
<b>Figura 5.</b>	Estrutura química da cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo.....	28
<b>Figura 6.</b>	Estrutura química das antocianinas dependendo do pH e reação de degradação das mesmas.....	29

### Material e Métodos

<b>Tabela 2.</b>	Planejamento de Experimentos 2 <sup>2</sup> com um ponto central.....	46
------------------	---	----

### Capítulo 1

<b>Table 1.</b>	Proximate composition, total soluble solids and pH values of jabuticaba fruit and its fractions.....	58
<b>Table 2.</b>	Mineral contents in 100 g of jabuticaba and its fractions.....	60
<b>Table 3.</b>	Percentage of Recommended Dietary Allowances (RDA) or Adequate Intakes (AI) of minerals for male and female adults (19-51 years) based on 200 mL of fresh jabuticaba pulp.....	61
<b>Table 4.</b>	Total phenolic, flavonoids and anthocyanins contents in jabuticaba fruit and its fractions.....	63
<b>Table 5.</b>	Phenolic compounds contents ( $\mu\text{g/g}$ dwb) in jabuticaba fruit and its fractions.....	65
<b>Table 6.</b>	Antioxidant activity measured by FRAP, ORAC and TEAC assays in jabuticaba fruit and its fractions.....	67

### Capítulo 2

<b>Table 1.</b>	Process parameters of the 2 <sup>2</sup> full factorial design.....	72
<b>Figure 1.</b>	Pareto chart of standardized effects of pressure and time on jabuticaba juice antioxidant activity measured by FRAP (A), ORAC (B) and TEAC (C) assays.....	76

<b>Table 2.</b>	Factorial design matrix for optimization of HHP conditions.....	77
<b>Figure 2.</b>	Antioxidant activity measured by FRAP, ORAC and TEAC assays of untreated (control) and HHP treated jabuticaba juices.....	78
<b>Figure 3.</b>	Pareto chart of standardized effects of pressure and time on jabuticaba juice phenolic compounds analyzed by HPLC-DAD: cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside (A), gallic acid (B), rutin (C), myricetin (D), total phenolic contents (E).....	79
<b>Figure 4.</b>	Surface response chart for cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside contents ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) measured by HPLC.....	80
<b>Figure 5.</b>	Phenolic compounds contents by HPLC-DAD of untreated (control) and HHP treated jabuticaba juices.....	81
<b>Table 3.</b>	Microbiological analyses of untreated (control) and HHP treated jabuticaba juices.....	82
<b>Table 4.</b>	Acceptance scores reported by consumers ( $n=80$ ) for untreated (control) and HHP treated jabuticaba juice at 350 MPa for 7.5 min.....	83
<b>Figure 6.</b>	Purchase intent scores reported by consumers ( $n=80$ ) for untreated (control) and HHP treated jabuticaba juice at 350 MPa for 7.5 min.....	83

## Anexos

<b>Anexo 1</b>	Cromatograma do ácido ascórbico da polpa da jabuticaba.....	95
<b>Anexo 2</b>	Cromatograma do perfil de carotenoides da fruta inteira da jabuticaba....	96
<b>Anexo 3</b>	Cromatograma do perfil de tocoferóis da fruta inteira da jabuticaba.....	97
<b>Anexo 4</b>	Cromatograma do perfil de compostos fenólicos antocianinas da fruta inteira da jabuticaba.....	98
<b>Anexo 5</b>	Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fração livre da casca da jabuticaba a 280 nm.....	99
<b>Anexo 6</b>	Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fração livre da casca da jabuticaba a 370 nm.....	100
<b>Anexo 7</b>	Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fração alcalina da casca da jabuticaba a 280 nm.....	101
<b>Anexo 8</b>	Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fração alcalina da casca da jabuticaba a 370 nm.....	102
<b>Anexo 9</b>	Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fração ácida da casca	

	da jabuticaba a 280 nm.....	103
<b>Anexo 10</b>	Cromatograma do perfil de compostos fenólicos da fração ácida da casca da jabuticaba a 370 nm.....	104
<b>Anexo 11</b>	Exemplo do questionário de hábito de consumo aplicado para a seleção dos voluntários da análise sensorial.....	105
<b>Anexo 12</b>	Exemplo de ficha sensorial empregada para investigar a aceitação dos sucos.....	106

## **Revisão Bibliográfica**

## 1. Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*)

### 1.1 Aspectos Botânicos e Cultivo

A jabuticabeira é uma planta frutífera pertencente à família *Myrtaceae* e ao gênero *Myrciaria*, também denominado de *Plinia*. É originária do Centro-Sul do Brasil e cultivada do extremo sul ao extremo norte do país. Contudo, é nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo onde ocorre a maior produção (Ascheri *et al.*, 2006; Citadin *et al.*, 2010; Sasso *et al.*, 2010).

As jabuticabeiras estão presentes, predominantemente, no bioma da Mata Atlântica, que devido à ação antrópica, atualmente tem apenas 8% da sua área original preservada, e destes, acredita-se que 75% esteja sob risco de extinção. A falta de conhecimento sobre o potencial da jabuticabeira e seu baixo aproveitamento comercial têm contribuído para sua erosão genética. Somado a isso, o alto custo das mudas, faz com que sua principal forma de cultivo seja pelo uso de sementes, o que desestimula sua cultura, já que a planta demora de 8 a 15 anos para entrar em produção (Citadin *et al.*, 2010; Colombo & Joly, 2010; Sasso *et al.*, 2010).

Diversas espécies foram descritas na literatura, mas apenas três têm dispersão natural e em cultivos no Brasil: *Myrciaria trunciflora* O. Berg (jabuticaba de cabinho), *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg (jabuticaba paulista, ponhema ou assu) e *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg (jabuticaba sabará) (Citadin *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013).

Existem controvérsias quanto à classificação das diferentes jabuticabeiras devido à grande variabilidade de seus atributos físicos e químicos, mas, em geral, a planta apresenta porte médio a grande, com 6 a 9 metros de altura, sendo caracterizada por apresentar flores que nascem diretamente dos troncos e ramos principais, dando-lhe a característica ornamental (**Figura 1**). A variedade Paulista é conhecida por apresentar grande porte e alta capacidade de produção, com frutos grandes e de maturação tardia. Já a variedade Sabará, é a mais apreciada e cultivada, com crescimento médio, produzindo frutos pequenos e doces (de Jesus *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Jabuticabeira

O fruto da jabuticabeira, denominado jabuticaba, é do tipo baga globosa, com casca fina e frágil, que apresenta até 3,5 cm de diâmetro. Sua coloração varia dependendo do estádio de maturação, de arroxeados a negro, apresenta polpa esbranquiçada e doce, levemente ácida, muito saborosa, contendo de 1 a 4 sementes (de Jesus *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2013).

## 1.2 Consumo e comercialização

A jabuticaba ainda é considerada uma planta frutífera e de pomares caseiros, com produção pequena e limitada a algumas regiões do país, onde famílias carentes coletam os frutos de plantas nativas, comercializando-os às margens de rodovias. Essa atividade informal é considerada de grande importância econômico-social, pois proporciona renda adicional a essas famílias durante o período de colheita (Citadin *et al.*, 2010).

A fruta apresenta grande potencial de comercialização, pois é apreciada tanto para consumo *in natura*, quanto para a fabricação de geleias, vinagres, licores, compota e bebidas fermentadas, podendo, também, ser aproveitada em indústrias alimentícias e farmacêuticas devido à sua elevada atividade antioxidante (Citadin *et al.*, 2010). Lima *et al.* (2008), descrevem, ainda, que a casca, rica em pigmentos, poderia ser utilizada como corante, gerando maior aproveitamento de resíduos e agregando valor à fruta.

No entanto, o período de comercialização do fruto da jabuticabeira é curto. A vida útil, de até três dias após a colheita, é decorrente da intensa perda de água, deterioração e fermentação da polpa. Assim, embora a jabuticaba seja popular em todo o país, apresente alta produtividade e características sensoriais desejáveis, a mesma não possui valor comercial elevado por ser muito perecível, o que prejudica a sua comercialização (Agostini *et al.*, 2009).

De acordo com Citadin *et al.* (2010), o cultivo comercial da fruta pode conquistar mercados, desde que seja desenvolvida pesquisa básica e tecnológica nesta cultura.

### **1.3 Caracterização química da jabuticaba**

Estudos acerca da caracterização química da jabuticaba e suas frações são recentes e ainda controversos. Relatos da literatura demonstraram que a fruta e suas frações apresentam elevados teores de umidade (71,5 a 88,8%), carboidratos (76,5 a 84,2 % base seca (bs)) e fibras (5,23 a 33,23% bs), baixos teores de lipídeos (0,5 a 2,0% bs), teores consideráveis de cinzas (2,4 a 3,9% bs) e baixos a moderados teores de proteínas (0,5 a 5,8% bs), com sua polpa apresentando cerca de 60 kcal/100 g em base fresca (Lima *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2011; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Alezandro *et al.*, 2013; Gurak *et al.*, 2014). Lima *et al.* (2011) descreveram ainda que as diferentes frações apresentam teores consideráveis de vitamina C (167,5 a 298,2 mg/100 g bs) e que a fruta é rica em açúcares, principalmente frutose (33,0% bs), glicose (26,4% bs) e sacarose (11,7% bs). Ademais, alguns autores descrevem que a jabuticaba pode ser considerada uma fonte alternativa de minerais como ferro, potássio, magnésio, manganês e cobre (Lima *et al.*, 2011; Alezandro *et al.*, 2013).

A intensa coloração arroxeadada da fruta indica que a mesma possui elevados teores de compostos fenólicos. De fato, alguns trabalhos demonstraram que a jabuticaba possui altos teores de compostos bioativos e atividade antioxidante (AA), sendo a casca, a fração a apresentar os maiores teores de compostos fenólicos (12,9 a 556,3 mg EAG/g bs) e antocianinas totais (15,1 a 20,6 mg/g bs) (Lima *et al.*, 2011; Leite-Legatti *et al.*, 2012; de Castro *et al.*, 2014). No que se refere ao perfil destes compostos, Wu *et al.* (2012) identificaram e quantificaram 22 compostos fenólicos na fruta da jabuticaba (ácidos gálico, elágico e elágico pentosídeo, casuariina, casuarinina, casuaricitina, pedunculagina, telimagrandina I e II, siringina-2-glicosídeo, dilactona do ácido valoneico, siringina, isoquercetrina, quercitina, quercitrina, querimeritrina e miricitrina), e observaram que as antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo (C3G) e delphinidina-3-*O*-glicosídeo (D3G) foram os compostos fenólicos majoritários.

### **1.4 Potenciais efeitos benéficos da jabuticaba na saúde**

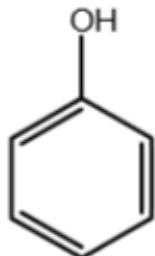
Estudos *in vitro* demonstraram que extratos da jabuticaba possuem elevada citotoxicidade em linhagens de células tumorais de câncer de cólon, sistema nervoso central,

pele, ovário, pulmão, próstata e leucemia, além de baixa toxicidade em células não tumorais. Observou-se, também, que compostos presentes na fruta apresentam importante ação anti-inflamatória, proporcionando uma nova terapia para o tratamento da doença obstrutiva pulmonar crônica (Reynertson *et al.*, 2006; Leite-Legatti *et al.*, 2012).

Por outro lado, estudos em modelos animais, que avaliaram o efeito do consumo de diferentes concentrações da casca da jabuticaba liofilizada, observaram aumento da atividade antioxidante do plasma, aumento das taxas do colesterol HDL e melhoria da resistência à insulina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, bem como melhoria do perfil lipídico e dos sintomas de polifagia e polidipsia em ratos diabéticos (Leite *et al.*, 2011; Lenquiste *et al.*, 2012; Dragano *et al.*, 2013; Alezandro *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem que a jabuticaba apresenta potencial efeito benéfico para a saúde.

## 2. Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, caracterizados por apresentarem uma ou mais hidroxilas ligadas diretamente a um anel benzênico (**Figura 2**), estrutura na qual todo o grupo de compostos se baseia (Vermerris & Nicholson, 2006).



**Figura 2.** Estrutura básica dos compostos fenólicos.  
(Fonte: Vermerris & Nicholson, 2006)

O termo “compostos fenólicos” abrange um grande grupo de compostos químicos, que podem ser classificados baseando-se no número de carbonos presentes na molécula. Dessa forma, compreendem desde moléculas simples ( $C_6$ ) a compostos altamente polimerizados ( $C_6-C_3-C_6)_n$  (**Tabela 1**). Apesar da grande diversidade estrutural, este grupo é denominado de polifenóis, dos quais as seguintes classes se destacam na dieta: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (Vermerris & Nicholson, 2006; Balasundram *et al.*, 2006).

Os polifenóis apresentam considerável importância fisiológica e morfológica em plantas, fornecendo proteção ao ataque de patógenos e predadores e contribuindo para a coloração e características sensoriais de frutas e vegetais (Sarkar & Shetty, 2014).

Os efeitos benéficos do consumo de frutas e hortaliças vêm sendo associados à presença destes compostos, que têm sido descritos por apresentarem elevada atividade antioxidante, bem como efeitos anti-inflamatórios e de proteção às doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (Wang & Stoner, 2008; Sancho *et al.*, 2012; McKay *et al.*, 2014; Sarkar & Shetty, 2014).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada não apenas à sua habilidade em sequestrar radicais livres, por meio da doação de átomos de hidrogênio presentes em hidroxilas posicionadas ao longo de seu anel aromático, mas também, podem estimular a atividade de enzimas antioxidantes, como glutatona peroxidase, glutatona S-transferase e catalase (Rice-Evans *et al.*, 1997; Hu, 2011; Sarkar & Shetty, 2014).

**Tabela 1.** Classe de compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura simplificada
Fenólicos simples, benzoquinonas	C <sub>6</sub>
Ácidos hidroxibenzóicos	C <sub>6</sub> –C <sub>1</sub>
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C <sub>6</sub> –C <sub>2</sub>
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C <sub>6</sub> –C <sub>3</sub>
Naftoquinonas	C <sub>6</sub> –C <sub>4</sub>
Xantonas	C <sub>6</sub> –C <sub>1</sub> –C <sub>6</sub>
Estilbenos, antoquinonas	C <sub>6</sub> –C <sub>2</sub> –C <sub>6</sub>
Flavonoides, isoflavonoides	C <sub>6</sub> –C <sub>3</sub> –C <sub>6</sub>
Lignanas, neolignanas	(C <sub>6</sub> –C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Biflavonoides	(C <sub>6</sub> –C <sub>3</sub> –C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Ligninas	(C <sub>6</sub> –C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Taninos condensados	(C <sub>6</sub> –C <sub>3</sub> –C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

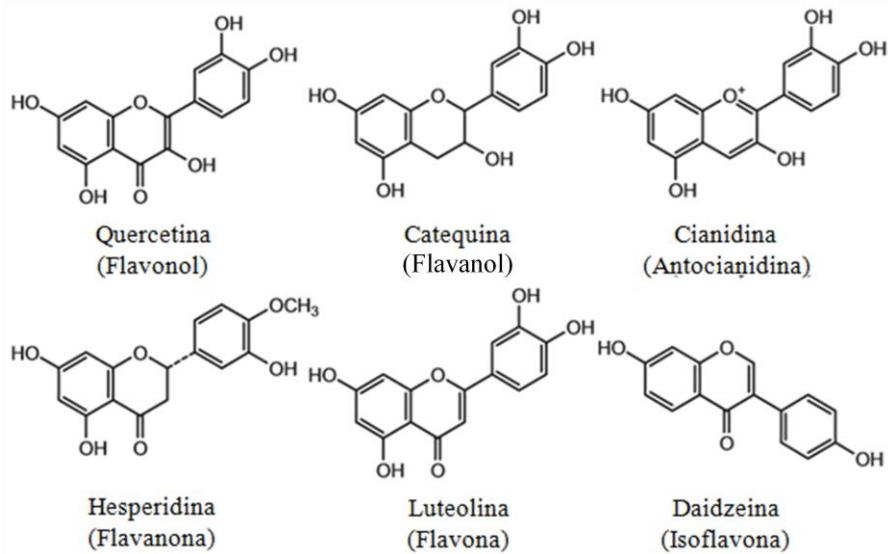
Fonte: Angelo & Jorge (2007)

As maiores fontes dietéticas de compostos fenólicos são produtos de origem vegetal, como hortaliças, frutas, em especial as frutas vermelhas, conhecidas como *berries*, e bebidas, como sucos de frutas, chás e vinhos (Balasundram *et al.*, 2006). Os resíduos agroindustriais resultantes do processamento de vegetais, como cascas e sementes, também têm recebido grande destaque em função dos elevados teores de polifenóis e, por este motivo, estudos têm sido realizados com o objetivo de promover o aproveitamento integral destes alimentos (Kammerer *et al.*, 2014).

Apesar de inúmeros relatos na literatura acerca dos elevados teores de compostos fenólicos em alimentos de origem vegetal, há uma grande variação entre os valores encontrados (Balasundram *et al.*, 2006), o que se deve em parte ao uso de diferentes metodologias. Os compostos fenólicos podem ser encontrados nos alimentos sob a forma livre e conjugada a carboidratos simples e polissacarídeos da matriz alimentar. Assim, dependendo do procedimento de extração utilizado, pode ocorrer subestimação de seus teores nos alimentos (Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

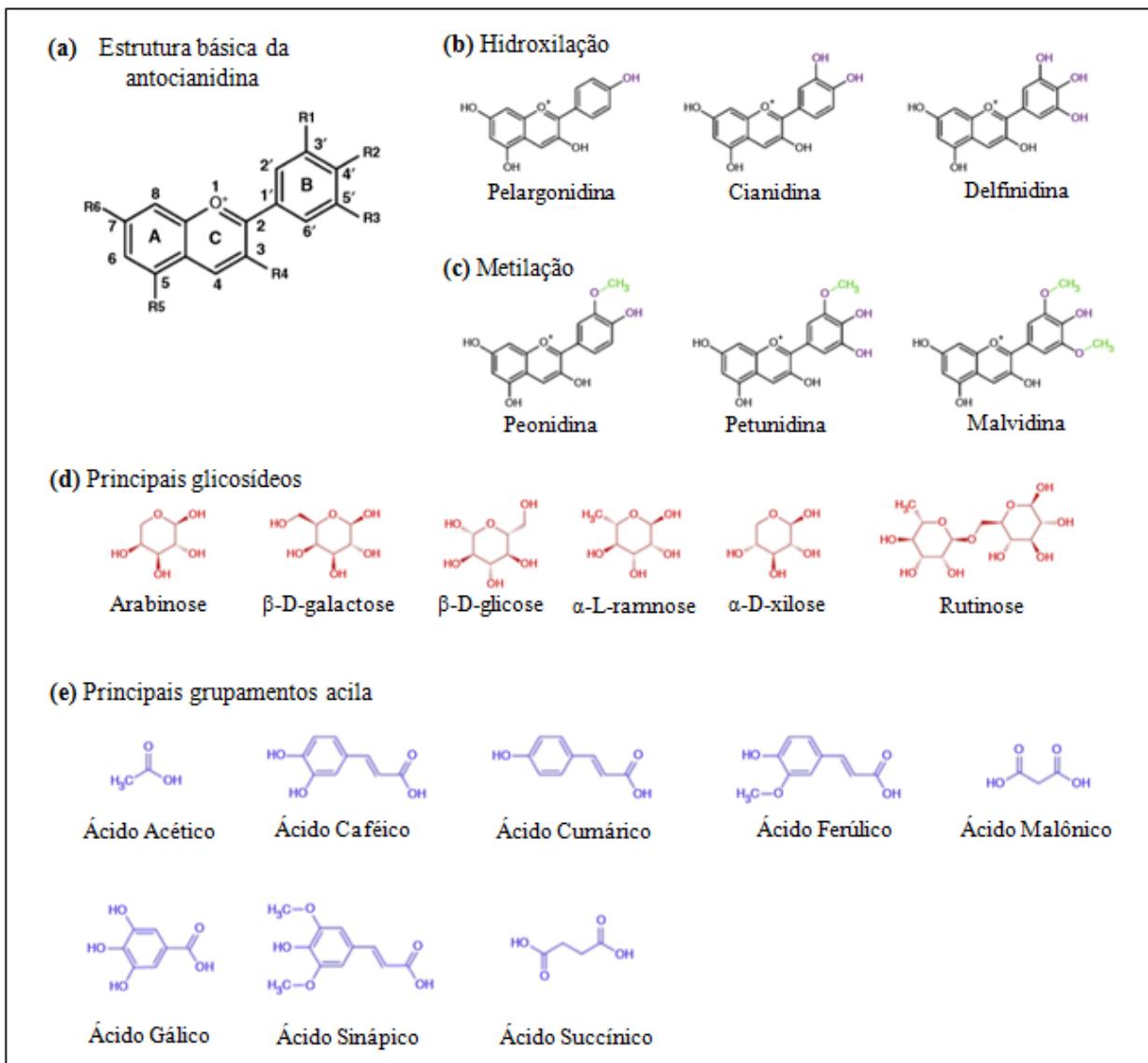
## 2.1 Antocianinas

Os flavonoides constituem o maior grupo de fenólicos, representando mais da metade dos oito mil compostos fenólicos já descritos na literatura. Sua estrutura molecular consiste em dois anéis aromáticos (A) e (B), unidos por um anel heterocíclico (C), condensado por um oxigênio. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes subclasses de flavonóides, dentre as quais se encontram as antocianidinas (**Figura 3**) (Balasundram *et al.*, 2006; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Agliconas representativas das subclasses dos flavonoides (Fonte: He & Giusti, 2010)

As antocianinas (do grego *anthos*, flor e *kyanos*, azul) (**Figura 4**) são pigmentos naturais, solúveis em água, responsáveis pela coloração vermelha, roxa e azul de muitas flores e frutos, tendo sua produção induzida em condições de estresse ou infecção por patógenos. Estes pigmentos apresentam grande importância para os vegetais, pois atraem polinizadores e dispersadores de sementes e atuam protegendo seus tecidos de danos oxidativos causados pela irradiação solar (Zhang *et al.*, 2014).

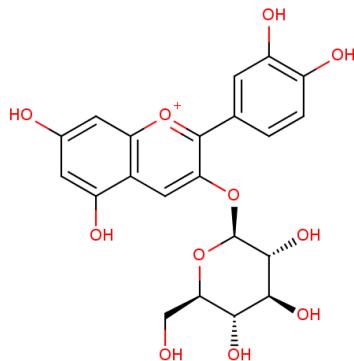


**Figura 4.** Estrutura básica das principais antocianidinas e grupamentos para formação das diferentes antocianinas encontradas na natureza (Fonte: Zhang *et al.*, 2014)

Já foram relatadas na literatura mais de 635 antocianinas e 23 antocianidinas (forma aglica das antocianinas), sendo as mais comuns, pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delfinidina. As diferenças entre as antocianinas estão relacionadas com o número e a posição dos grupos hidroxila, à metilação e à presença ou ausência de açúcares e ácidos alifáticos ou aromáticos (**Figura 4**) (Zhang *et al.*, 2014).

As formas aglicas das antocianinas apresentam baixa estabilidade e por isso, normalmente encontram-se glicosiladas e/ou aciladas (Vermerris & Nicholson, 2006; He & Giusti, 2010). Geralmente, a glicosilação das antocianidinas ocorre na posição 3 do anel C, sendo os açúcares mais comuns glicose, ramnose, galactose, arabinose ou xilose (**Figura 5**). No entanto, também pode ocorrer glicosilação nas posições 5 e 7 do anel A e nas posições 3'

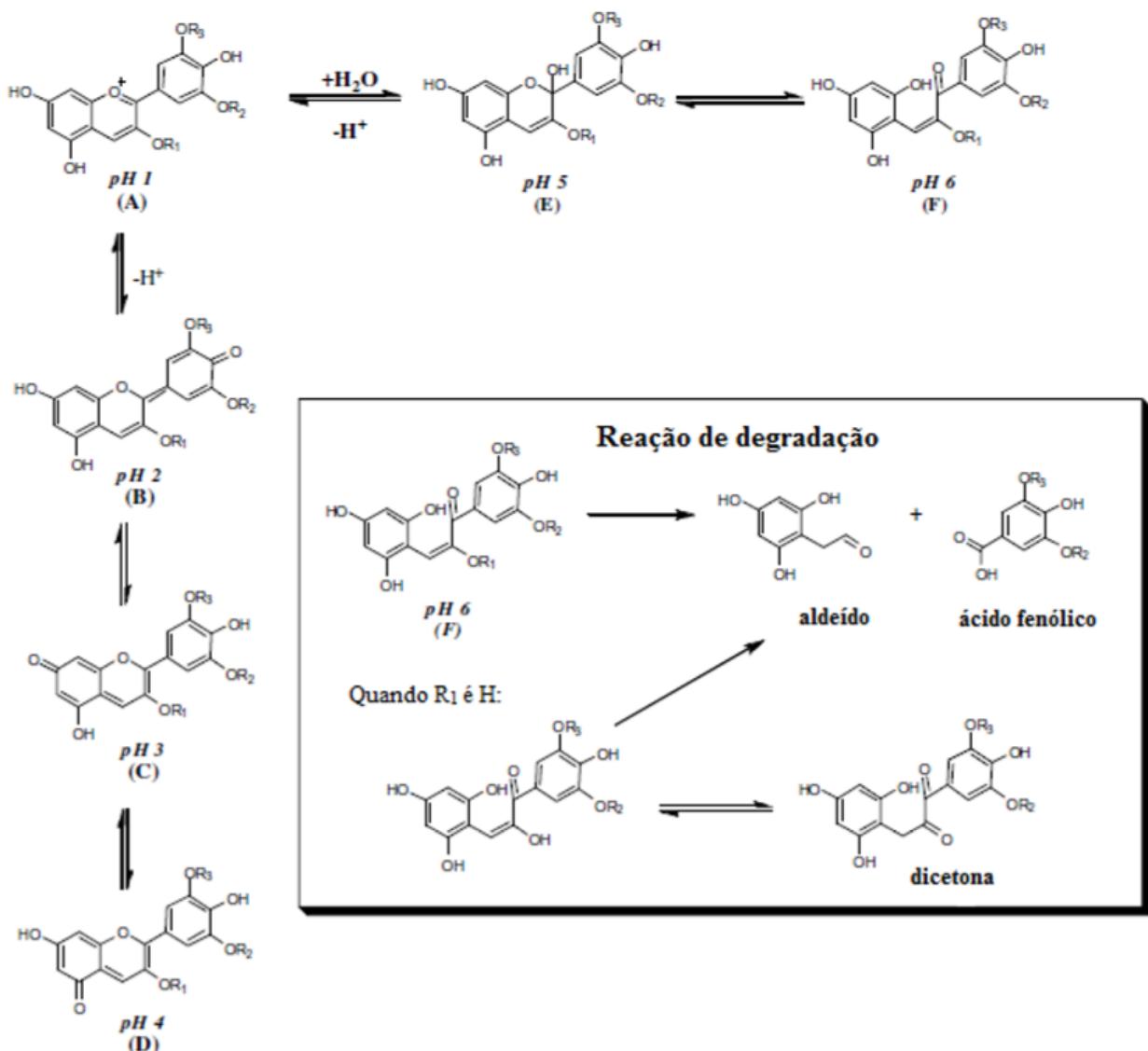
e 5' do anel B. Glicosilações adicionais fornecem mais resíduos de açúcar para acilação das antocianinas com ácidos aromáticos (*p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico ou *p*-hidroxibenzoíco) ou ácidos alifáticos (malônico, acético, málico, succínico, tartárico e oxálico), que afetam a coloração e aumentam a estabilidade destes pigmentos (Zhang *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Estrutura química da cianidina-3-*O*-glicosídeo. (Fonte: Phenol Explorer)

Além da estrutura química, a estabilidade das antocianinas também é afetada por fatores como pH, sua concentração no alimento, temperatura de estocagem, exposição à luz e oxigênio, solventes e presença de enzimas, flavonoides, proteínas e íons metálicos (Bakowska *et al.*, 2003).

As antocianinas podem ser encontradas sob diferentes formas químicas de acordo com o pH do meio. Em pH 1,0 o cátion flavílio (**Figura 6A**) é predominante, contribuindo para a coloração roxa e vermelha. Em valores de pH entre 2,0 e 4,0 predomina a base quinoidal (**Figura 6A-D**) responsável pela cor azul. Em pH com valores de 5,0 e 6,0, apenas duas espécies incolores são observadas, sendo, respectivamente, as pseudo-bases carbinol (**Figura 6E**) e chalcona (**Figura 5F**). Em valores de pH maiores que 7,0, as antocianinas podem degradar-se, dependendo de seus grupos substituintes (**Figura 6, reação de degradação**) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). A baixa estabilidade das antocianinas, especialmente em elevadas faixas de pH, é a principal dificuldade do uso destes pigmentos como corantes nas indústrias de alimentos (Zhang *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Estrutura química das antocianinas dependendo do pH e reação de degradação das mesmas. Onde R<sub>1</sub>=H ou açúcar, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>=H ou grupo metil (Fonte: Castañeda-Ovando *et al.*, 2011).

### 3. Métodos de Conservação

Atualmente, a segurança e a qualidade de alimentos estão entre os mais importantes fatores que influenciam a escolha do consumidor, que demanda produtos frescos, de alta qualidade, livres de aditivos, microbiologicamente seguros e com maior tempo de prateleira. Esta demanda tem levado a indústria alimentícia a buscar métodos de conservação alternativos (Buzrul, 2012).

Métodos de processamento tradicionais, como a pasteurização e o processamento por UHT (*ultra high temperature*), são amplamente empregados na conservação de sucos de frutas (Castro, 2012) e fazem uso de temperaturas elevadas para obtenção da segurança

microbiológica e maior tempo de prateleira. O calor, no entanto, pode levar à deterioração da qualidade dos produtos por produzir mudanças indesejáveis em suas características sensoriais e nutricionais (Laboissière *et al.*, 2007). Com o objetivo de evitar tais mudanças, técnicas não térmicas de processamento de alimentos tem recebido atenção nas últimas décadas (Hartyàni *et al.*, 2011).

Dentre estes métodos, destaca-se a alta pressão hidrostática (APH), tecnologia não térmica, que permite a inativação microbiana e enzimática, com objetivo de aumentar a segurança e a vida de prateleira de produtos perecíveis, enquanto preserva as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (Laboissière *et al.*, 2007; Buzrul *et al.*, 2012; Varela-Santos *et al.*, 2012; Barba *et al.*, 2013).

### **3.1 Alta Pressão Hidrostática (APH)**

Os primeiros estudos sobre o efeito da APH nos alimentos foram realizados no século XIX. No entanto, seu desenvolvimento científico e seu potencial de aplicação na indústria de alimentos como alternativa aos métodos térmicos de conservação somente foram reconhecidos nas últimas décadas (Suzuki, 2002; Hogan *et al.*, 2005).

O processamento por APH consiste em submeter o produto a níveis de pressão hidrostática que variam de 50 a 1000 MPa (Hogan *et al.*, 2005). Estes valores superam àqueles comumente empregados nos tratamentos convencionais, sendo capaz de transmitir pressão isostática imediatamente ao produto, independente do tamanho, forma ou composição (Varela-Santos *et al.*, 2012). Apesar de ser considerado um método não térmico de processamento, o aumento da pressão gera um pequeno aumento na temperatura, de aproximadamente 3 °C a cada 100 MPa, variando de acordo com a composição do alimento (Rendueles *et al.*, 2011).

Um sistema completo de APH é composto por um tanque contendo o líquido transmissor de pressão, uma câmara de pressurização com pistão para fechamento, um sistema gerador de pressão (bomba) e um dispositivo controlador da temperatura (Huppertz *et al.*, 2002). O alimento embalado é inserido na câmara e imerso no meio transmissor de pressão, que pode ser água adicionada de óleos, benzoato de sódio, etanol ou glicóis. A câmara é fechada e pressurizada por meio da bomba e/ou pistão e assim que a pressão desejada é atingida, o acionamento da bomba ou pistão é interrompido, as válvulas são fechadas e a câmara é mantida pressurizada, sem requerimento de energia adicional. Após o término do tempo de pressurização, a despressurização é realizada rapidamente. Uma das

vantagens do uso da APH é que, geralmente, o alimento é pressurizado em sua embalagem final, reduzindo o risco de contaminação e tornando o alimento seguro até sua abertura pelo consumidor (Hogan *et al.*, 2005; Chawla *et al.*, 2011).

Um dos princípios que regem o sistema de APH é o de *Le-Chatelier*. De acordo com este princípio, quando um estresse é aplicado a um sistema em equilíbrio, o mesmo reage de modo a neutralizar a tensão aplicada, gerando reações que acarretam a inativação de micro-organismos, enzimas ou alterações na textura dos alimentos (Hogan *et al.*, 2005). A eficácia do tratamento depende do nível de pressão e do tempo utilizados, sendo a resistência dos micro-organismos variável de acordo com as suas características celulares, com a matriz alimentar e pH do meio (Rendueles *et al.*, 2011).

Os danos celulares provocados pela APH variam de acordo com os níveis de pressão e tempo aplicados, sendo a membrana celular um dos principais alvos deste processamento. O aumento da pressão gera alterações na permeabilidade da membrana, com consequente perda de integridade e extravasamento celular. Como resultado, ocorrem mudanças morfológicas e fisiológicas, afetando a nutrição e a eliminação de resíduos celulares e prejudicando as vias metabólicas. Em acréscimo, outros danos são gerados pela APH, como inibição da síntese protéica e redução do número de ribossomos, degradação do DNA, alongamento celular, compressão dos vacúolos gasosos e desnaturação reversível ou irreversível de enzimas e proteínas. A morte celular ocorre quando o dano acumulado excede a capacidade de reparação da célula (Rendueles *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014).

Em geral, quanto mais elevado é o grau de organização e a complexidade estrutural do organismo, maior é a sua sensibilidade à pressão (Mor-Mur & Yuste, 2005). As bactérias gram-negativas são mais sensíveis à pressão, sendo destruídas em pressões de 300 a 400 MPa, em comparação às gram-positivas, que são inativadas à pressões de 500 a 600 MPa (Chawla *et al.*, 2011). Além disso, os micro-organismos apresentam maior resistência na fase estacionária que na exponencial, o que pode estar associado ao fato de que na fase estacionária os mesmos sintetizam proteínas que os protegem de condições adversas (Huang *et al.*, 2014).

A maioria das células vegetativas sofrem reduções significativas em pressões de 400 a 600 MPa à temperatura ambiente. Dentre estas, os patógenos de origem alimentar apresentam significativa perda de viabilidade em pressões relativamente baixas (300 MPa) quando combinadas a temperaturas intermediárias (50 °C) (Rendueles *et al.*, 2011). Por outro lado, os esporos bacterianos não podem ser inativados unicamente pela aplicação da APH, podendo sobreviver a tratamentos superiores a 1000 MPa. Dessa forma, é necessário o uso de

tratamentos combinados capazes de reduzir a contagem dos esporos mais resistentes, como os dos gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, aplicando-se pressões de 800 MPa à temperaturas de 70 °C e/ou usando-se baixos valores de pH (4,5) (Rendueles *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014).

Como já dito anteriormente, uma das vantagens da APH é a sua capacidade de aumentar a vida de prateleira, enquanto preserva as características nutricionais e sensoriais dos alimentos. Diferentemente dos métodos térmicos tradicionais, estudos têm demonstrado que a APH é capaz de promover melhor retenção da atividade antioxidante e dos compostos bioativos de frutas e hortaliças e seus produtos (Ferrari *et al.*, 2011; Barba *et al.*, 2013; Tadapaneni *et al.*, 2014). Este processamento seria ainda capaz de aumentar a extractabilidade e a potencial bioacessibilidade de compostos fenólicos, carotenoides e licopeno devido a mudanças microestruturais, que alterariam a permeabilidade da membrana e o rompimento da parede celular, favorecendo a liberação destes compostos da matriz alimentar (Vázquez-Gutierrez *et al.* 2013; Tadapaneni *et al.*, 2014).

No que se refere às características sensoriais dos alimentos, estudos que avaliaram o efeito do processamento por APH em sucos de frutas, utilizando níveis de pressões de 200 a 600 MPa não observaram diferenças significativas entre os produtos processados e o controle (Laboissière *et al.*, 2007; Oye *et al.*, 2008). No entanto, como a APH pode aumentar ou retardar reações químicas e enzimáticas, promover alterações em moléculas de baixo peso molecular que conferem aroma e sabor, alterações indesejáveis no *flavor* de alguns alimentos podem ocorrer (Oye *et al.*, 2008; Rendueles *et al.*, 2011). Para certos produtos alimentares, o tratamento com APH pode induzir mudanças desejáveis na textura e estrutura do produto e, por conseguinte, ser utilizado para o desenvolvimento de novos produtos, como por exemplo, as geleias (Hugas *et al.*, 2002; Oey *et al.*, 2008).

## **Justificativa**

Diante do exposto acima, apesar de apresentar características sensoriais desejáveis e elevados teores de compostos bioativos, a jabuticaba, fruta de elevado potencial funcional, tem sua comercialização prejudicada por ser muito perecível. Desta forma, a caracterização química de suas frações e a aplicação do processamento por alta pressão hidrostática no desenvolvimento de suco de jabuticaba poderão contribuir para o aproveitamento sustentável da fruta, além de estimular o consumo nacional e internacional da mesma, promovendo sua valorização econômica.

## **Objetivos**

**OBJETIVO GERAL:**

Avaliar a composição de nutrientes e de compostos bioativos da jabuticaba, e de suas frações, e avaliar o efeito do processamento por alta pressão hidrostática sobre os compostos bioativos do suco.

Os resultados desse trabalho foram divididos em dois capítulos, redigidos em língua inglesa, um abordando a caracterização química detalhada da jabuticaba e suas frações (Capítulo 1) e outro abordando o efeito do processamento do suco de jabuticaba por alta pressão hidrostática sobre a atividade antioxidante, teores de compostos bioativos e a qualidade microbiológica e sensorial (Capítulo 2).

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Determinar a composição centesimal e os teores de minerais da fruta inteira da jabuticaba e de suas frações (casca, semente, polpa e resíduo) (Capítulo 1);
- Determinar os teores totais de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas e a atividade antioxidante da jabuticaba e de suas frações (casca, semente, polpa e resíduo) (Capítulo 1);
- Determinar os teores totais de totais de ácido ascórbico da polpa da jabuticaba (Capítulo 1);
- Avaliar o perfil e os teores de carotenoides e tocoferóis do fruto da jabuticaba (Capítulo 1);
- Avaliar o perfil e os teores de compostos fenólicos do fruto da jabuticaba e de suas frações (casca, semente, polpa e resíduo) (Capítulo 1);
- Investigar o efeito do processamento por alta pressão hidrostática sobre a qualidade microbiológica, os teores de compostos bioativos e a atividade antioxidante do suco de jabuticaba (Capítulo 2);
- Avaliar o efeito do processamento por alta pressão hidrostática sobre a aceitação sensorial dos sucos elaborados (Capítulo 2);

## **Material e Métodos**

## **1. Amostras**

Amostras de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*, cv. Sabará) provenientes do estado de Minas Gerais foram adquiridas, no período da safra (outubro de 2012), na central de abastecimento do Estado da Guanabara (CADEG), sendo posteriormente selecionadas, lavadas e sanitizadas em solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm durante 15 minutos. Uma parte das frutas foi congelada inteira e outra parte, por meio da utilização de uma despolpadeira horizontal, foi separada em polpa e resíduo (junção da casca e semente), que por sua vez, foram separados manualmente. A fruta inteira, polpa, casca, semente e resíduo da jabuticaba foram liofilizados.

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1997) define suco integral como “suco na concentração original da fruta, sem adição de açúcar”. Dessa forma, a polpa da jabuticaba foi considerada como suco integral desta fruta. Todas as amostras foram congeladas a -20°C.

## **2. Composição centesimal, pH e sólidos solúveis totais**

Os teores de umidade, proteínas, lipídios, fibra dietética total, cinzas e pH foram determinados em triplicata no fruto inteiro da jabuticaba e suas frações, sendo considerado o fator de conversão de 6,25 para determinação dos teores de proteínas. Já os teores de sólidos solúveis totais foram determinados na polpa e fruta inteira, de acordo com métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000). Os teores de carboidrato foram calculados pela diferença entre 100% e a soma das porcentagens de umidade, proteína, lipídeos totais e cinzas, e incluem a fibra dietética total. Os valores energéticos foram calculados a partir dos teores de lipídios (9 kcal/g), proteínas (4 kcal/g) e carboidratos (4 kcal/g), excluindo a fibra dietética total.

## **3. Composição Mineral**

### **3.1 Preparo da Amostra**

A digestão das amostras foi realizada de acordo com os métodos oficiais da AOAC (2000). Amostras liofilizadas (fruta inteira, polpa, casca, semente e resíduo) e a polpa da jabuticaba seca em estufa a 105 °C foram carbonizadas em placa aquecedora. Em seguida, as

amostras foram colocadas em mufla a 450 °C por 6 horas. Ao final deste período, as cinzas foram umedecidas com água Milli-Q e foi adicionado 1 mL de ácido nítrico concentrado, aquecendo em placa até completa secagem. As amostras foram aquecidas em mufla a 450 °C, repetindo a adição de ácido até a obtenção de cinzas claras. As cinzas foram dissolvidas com solução de 10% de ácido nítrico ultrapuro em água Milli-Q.

### **3.2 Determinação dos macrominerais**

Para a determinação das concentrações dos elementos cálcio, enxofre, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio e sódio nos extratos de jabuticaba utilizou-se um espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP OES), com configuração de visão dupla (axial e radial), marca Thermo Scientific, modelo iCAP 6300 (Cambridge, Inglaterra), equipado com câmara de nebulização ciclônica, nebulizador do tipo MiraMist (Mira Mist CE, Burgener Research Inc., Ontario, Canadá), detector do tipo dispositivo de carga acoplado (CCD) e software operacional iTEVA 2.0 para a aquisição de dados. As determinações de Fe ( $\lambda = 249.940$ ), K ( $\lambda = 769.896$ ), Mn ( $\lambda = 257.610$ ), Na ( $\lambda = 589.592$ ), P ( $\lambda = 213.618$ ) e S ( $\lambda = 182.034$ ) foram realizadas na vista axial, enquanto que as determinações de Ca ( $\lambda = 393.366$ ) e Mg ( $\lambda = 280.270$ ) foram realizadas na vista radial. Foram utilizadas curvas analíticas com seis soluções padrão para a calibração e a quantificação foi realizada por interpolação. As condições operacionais do instrumento foram 1200 W de potência incidente; 12 L/minuto de vazão de gás do plasma; 1.0 L/minuto de vazão de gás auxiliar; 0.19 de pressão do nebulizador; 50 rpm de velocidade de rotação da bomba peristáltica durante a aquisição de dados; 1 segundo de tempo de integração.

### **3.3 Determinação dos microminerais**

Para a determinação das concentrações de cobalto, cobre, cromo, manganês, selênio e zinco em extratos de jabuticaba, utilizou-se um espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), marca Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemanha), modelo iCAP Qc, equipado com célula de colisão e de reação, cones de amostragem (“*sample cone*”) e escuma (“*skimmer*”) de níquel, câmara de nebulização ciclônica de duplo passo (“*baffled*”) de quartzo, nebulizador concêntrico de Teflon® (FPA-ST), Peltier, injetor de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno, amostrador automático marca CETAC, modelo ASX 520 (CETAC Technologies, Omaha, Nebraska, USA) e software operacional Qtegra (versão

1.5.1189.1) para a aquisição dos dados. As condições de operação do equipamento foram: 1550 W de potência incidente, 14 L min<sup>-1</sup> de vazão de gás no plasma, 0,80 L min<sup>-1</sup> de vazão de gás auxiliar, 1,0 L min<sup>-1</sup> de vazão de gás do nebulizador, *dwell time* de 10 ms e 1 canal por unidade de massa. Os elementos na forma dos isótopos <sup>52</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>59</sup>Co, <sup>65</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>82</sup>Se foram determinados em modo “padrão” (“Standard”). Para correção de interferências de transporte na introdução da amostra e de ionização, foi realizada a padronização interna com a adição e monitoramento dos isótopos <sup>45</sup>Sc, <sup>73</sup>Ge, <sup>103</sup>Rh e <sup>205</sup>Tl, todos na concentração final de 5 µg L<sup>-1</sup>. As determinações dos analitos foram realizadas utilizando curvas analíticas com sete soluções padrão para a calibração e a quantificação foi realizada por interpolação.

#### **4. Análise de carotenoides e tocoferóis por CLAE**

A extração das amostras foi realizada em triplicata, de acordo com a metodologia descrita por Gimeno *et al.* (2000), com modificações. A fruta da jabuticaba liofilizada foi extraída com 5 mL de metanol e 5 mL de hexano em banho de ultrasom por 5 minutos e agitada em vortex por 5 minutos. Após a centrifugação (1690 g, 10 minutos, 10 °C), o sobrenadante foi coletado e o resíduo re-extraído três vezes, seguindo o mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram combinados, o solvente removido e o resíduo seco reconstituído em hexano.

O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®, Japão) incluiu uma bomba quaternária LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, sistema CBM-20A como controlador e degaseificador DGU-20A5. A separação cromatográfica dos carotenoides e tocoferóis foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE de fase normal de sílica (5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Zorbax®) e eluição isocrática com hexano:isopropanol (99:1, v/v), utilizando-se fluxo de 1,0 mL/minuto (Tan & Brzuskieicz, 1989). Carotenoides e tocoferóis foram monitorados em detector DAD a 450 nm e 295 nm, respectivamente. A identificação dos analitos foi realizada por comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção do respectivo padrão e a quantificação foi realizada por calibração externa. Os dados de integração foram adquiridos pelo *software* LC solution (Shimadzu Corporation®, version 1.25, 2009).

## **5. Análise de ácido ascórbico por CLAE**

A polpa da jabuticaba foi centrifugada (11300 g, 5 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante diluído em tampão fosfato de potássio 2%, pH 2,32 ajustado com HCl. O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®, Japão) incluiu uma bomba quaternária LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, sistema CBM-20A como controlador e degaseificador DGU-20A5. A separação cromatográfica do ácido ascórbico foi obtida utilizando-se uma coluna de CLAE de fase reversa C18 (5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Kromasil®), de acordo com Paulo *et al.* (1999), com modificações. A fase móvel consistiu em eluição isocrática do tampão fosfato de potássio 2%, utilizando-se um fluxo de 0,4 mL/minuto e absorbância de 243 nm. A identificação do ácido ascórbico foi realizada por comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção do respectivo padrão e a quantificação foi realizada por calibração externa. Os dados de integração foram adquiridos pelo *software* LC solution (Shimadzu Corporation®, version 1.25, 2009).

## **6. Análise de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas monoméricas por métodos espectrofotométricos**

Os extratos das amostras, com exceção da polpa da jabuticaba, foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Rufino *et al.* (2010) com modificações. As amostras foram extraídas com metanol aquoso 50% em extrator Ultraturrax (T18 BASIC, IKA®) a 14000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação (1700 g, 10 min, 20 °C), o resíduo foi re-extraído com metanol 50% e, em seguida, com acetona:água:ácido acético (70:29.5:0.5, v/v/v), quantas vezes foram necessárias, até a obtenção de sobrenadante incolor. Os sobrenadantes foram combinados e filtrados em papel de filtro (Whatman no. 1). A polpa da jabuticaba foi analisada logo após a centrifugação (11300 g, 10 min, temperatura ambiente). Todas as extrações foram realizadas em triplicata. Os extratos foram armazenados congelados, a -20 °C, até a realização das análises.

Os teores de compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteau, conforme descrito por Singleton *et al.* (1999). Duzentos microlitros do extrato foram misturados com 1400 µL de água Milli-Q, 100 µL de reagente Folin-Ciocalteau e 300 µL de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20%. Após a homogeneização, a mistura foi mantida a 40 °C por 30 minutos. A absorbância da solução foi medida a 765 nm, usando o

espectrofotômetro de microplacas Vitor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter (PerkinElmer®, Turku, Finland) e a quantificação foi realizada pela curva padrão de ácido gálico (EAG), sendo os resultados expressos em mg de EAG/g de base seca (bs). Cada extrato foi analisado em triplicata.

Os teores de flavonoides totais foram determinados pelo método espectrofotométrico descrito por Taie *et al.* (2008). Quinhentos microlitros do extrato foram misturados com 500 µL de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). Após 1 hora em temperatura ambiente, a leitura da absorbância da mistura foi realizada a 405 nm. A quantificação foi realizada utilizando-se curva padrão de cianidina-3-O-glicosídeo (C3G), sendo os resultados expressos em mg/g de base seca (bs). Cada extrato foi analisado em triplicata.

Os teores de antocianinas monoméricas foram determinados pelo método do pH diferencial descrito por Souza *et al.* (2014). Os extratos foram misturados com solução tampão com pH 1,0 e pH 4,5, utilizando-se o mesmo fator de diluição. A leitura da absorbância em cada pH foi realizada a 510 nm e 700 nm. A quantificação foi realizada utilizando as seguintes fórmulas:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \quad (1)$$

$$TMA = (A \times PM \times fd \times 1000) / \varepsilon \quad (2)$$

onde, A é a absorbância, PM é o peso molecular da C3G (449 g/mol), fd é o fator de diluição e  $\varepsilon$  o coeficiente de extinção molar da C3G (29,600 L/mol.cm).

Os resultados foram expressos em equivalentes de C3G/g em base seca. Cada extrato foi analisado em triplicata.

## 7. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos métodos FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) e ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Capacity*).

O ensaio de FRAP foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Benzie & Strain (1996). As soluções estoque de tampão acetato 300 mM (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10 mM e cloreto de ferro 20 mM foram utilizadas para o preparo do reagente de FRAP, nas proporções de 10:1:1, respectivamente. O reagente foi mantido à temperatura de 37 °C até o momento de sua utilização. Foram pipetados 20 µL das diferentes

concentrações do padrão e das amostras em uma placa de 96 poços. A leitura foi feita em espectrofotômetro de microplacas (Victor<sup>3</sup><sub>TM</sub> 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer<sup>®</sup>) com injeção automática de 180 µL do reagente de FRAP para iniciar a reação. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm. A quantificação foi realizada utilizando-se uma curva padrão de sulfato ferroso. Os resultados foram expressos em mmol de Fe<sup>+2</sup>/g de base seca. Cada extrato foi analisado em triplicata.

O ensaio de TEAC foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de Re, Pellegrini & Proteggente (1999). O preparo da solução estoque do radical 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) de diamônio (ABTS) foi realizada pela reação entre persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) e ABTS por 12 a 16 h antes do uso. A solução estoque do radical ABTS foi diluída (1:50) de forma que a leitura da absorbância da solução, a 720 nm, fosse de 0.70±0.02. Dez microlitros do extrato foram pipetados em placa de 96 poços, que foi inserida no espectrofotômetro de microplacas (Victor<sup>3</sup><sub>TM</sub> 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer<sup>®</sup>) com injeção automática de 190 µL da solução diluída do radical ABTS. A placa foi agitada e mantida a 37 °C durante 6 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 720 nm e subtraída da absorbância do branco. A quantificação foi realizada utilizando-se uma curva padrão de Trolox. Os resultados foram expressos em mmol de equivalentes de Trolox/g base seca. Cada extrato foi analisado em triplicata.

O ensaio de ORAC foi realizado de acordo com metodologia adaptada de Zulueta *et al.* (2009). Para as análises, 100 µL de fluoresceína (7,8 µM) e 100 µL do extrato foram pipetados em microplaca de 96 poços, que foi inserida no espectrofotômetro de microplacas (Victor<sup>3</sup><sub>TM</sub> 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer<sup>®</sup>) com injeção automática de 50 µL da solução de AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido) 221 M. A placa foi agitada e a leitura da absorbância foi realizada sob excitação a 485 nm e emissão a 535 nm, com ciclos de 30 segundos entre as leituras até a completa degradação da fluoresceína. A quantificação foi realizada pela diferença entre as áreas sob a curva das amostras e do branco. A curva padrão foi preparada usando Trolox e os resultados foram expressos em mmol de equivalentes de Trolox/g base seca. Cada extrato foi analisado em triplicata.

## 8. Análise de compostos fenólicos por CLAE-DAD

### *Extração*

Para a análise das antocianinas, foram utilizados os mesmos extratos das análises espectrofotométricas.

A extração dos compostos fenólicos livres e conjugados (não-antocianinas) da jabuticaba foi realizada em triplicata, de acordo com a metodologia adaptada de Dinelli *et al.* (2011). Para os compostos fenólicos livres, 1 g das amostras liofilizadas (fruta inteira, casca, semente e resíduo) e 10 g da polpa de jabuticaba fresca foram extraídas por 10 minutos com 20 mL de etanol aquoso 80% gelado e centrifugadas (2500 g, 5 min, 10 °C). O sobrenadante foi coletado e o resíduo re-extraído. Os sobrenadantes foram combinados, o solvente removido em rotaevaporador e o resíduo seco foi reconstituído em água.

Para a hidrólise alcalina, o resíduo da extração dos compostos fenólicos livres foi incubado com 12 mL de água e 5 mL de NaOH (10 M) à temperatura ambiente e no escuro por 16 horas sob agitação. Após esse período, o pH foi ajustado para 2 e a mistura foi extraída por 30 segundos com 15 mL de acetato de etila. Após a centrifugação (2500 g, 5 min, 10 °C), o sobrenadante foi coletado e a extração com acetato de etila repetida duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados, o solvente removido e o resíduo seco reconstituído em metanol aquoso 80%.

Para a hidrólise ácida, o resíduo da extração da hidrólise alcalina foi incubado com 2,5 mL de HCl concentrado a 85 °C durante 30 minutos. Em seguida, o mesmo foi submetido à extração com acetato de etila, descrita anteriormente para a hidrólise alcalina.

Os sucos da jabuticaba controle e processados por APH foram analisados logo após a centrifugação (11300 g, 10 min). Para as análises por CLAE, todos os extratos foram filtrados em filtro de membrana de éster de celulose, com tamanho de poro de 0,45 µm (Millipore®, Brazil)

#### *Condições cromatográficas*

O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®, Japão) incluiu uma bomba quaternária LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A, sistema CBM-20A como controlador e degaseificador DGU-20A5.

A separação cromatográfica das antocianinas foi realizada utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 (5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Kromasil®). A fase móvel consistiu em um gradiente das soluções de ácido fórmico aquoso 1% (eluente A), ácido fórmico em metanol 1% (eluente B) e acetonitrila (eluente C), com fluxo de 2,0 mL/min. A concentração do eluente C foi mantida constante, a 2%, durante toda a análise. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 18% do eluente B. Após a injeção da amostra, essa proporção foi mantida constante até 2 minutos, aumentando para 32% de B em 6 minutos e para 52% de B em 8 minutos e em seguida, diminuindo para 18% de B em 18 minutos. Entre as injeções,

intervalos de 10 minutos foram utilizados para re-equilibrar a coluna com 18% do eluente B. As antocianinas foram monitoradas por detector DAD a 530 nm.

A separação cromatográfica dos compostos fenólicos (não-antocianinas) foi realizada utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 (5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Phenomenex®). A fase móvel consistiu em gradiente das soluções de ácido fórmico aquoso 0,3% (eluente A), metanol (eluente B) e acetonitrila (eluente C), com um fluxo de 1,0 mL/min. A concentração do eluente C foi mantida constante, a 1%, durante a análise. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 18% do eluente B. Após a injeção da amostra, essa proporção aumentou para 20% de B em 1 minuto, 43% de B em 18 minutos e 85% de B em 23 minutos, sendo mantida constante até 30 minutos. Entre as injeções, intervalos de 10 minutos foram utilizados para re-equilibrar a coluna com 18% do eluente B. Os compostos fenólicos (não-antocianinas) foram monitorados por detector DAD de 190 a 370 nm. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção do respectivo padrão e a quantificação foi realizada por calibração externa. Os dados de integração foram adquiridos pelo software LC solution (Shimadzu Corporation®, versão 1.25, 2009).

## 9. Processamento por APH

Cinquenta mililitros do suco de jabuticaba foram descongelados, embalados em sacos com 5 camadas *nylon/poly*, com barreira de oxigênio e selados à vácuo (TecMaq®, Brasil). As amostras foram submetidas ao processamento em gerador de APH de escala piloto para laboratório (Bras Solution Ltda., Rio de Janeiro, Brasil), usando como meio transmissor de pressão, água destilada e fluido sintético a base de carboxilatos, na proporção de 2:1 (v/v). O planejamento de experimentos fatorial completo 2<sup>2</sup> com um ponto central, em duplicata, foi utilizado para otimizar o tratamento, adotando, como variáveis independentes, a pressão e o tempo, totalizando 10 corridas experimentais (**Tabela 2**) e como variáveis dependentes, foram consideradas a qualidade microbiológica, a atividade antioxidante avaliada por FRAP, TEAC e ORAC e os teores de compostos fenólicos por CLAE-DAD.

**Tabela 2.** Planejamento de Experimentos 2<sup>2</sup> com um ponto central

Parâmetro	Níveis		
	-1	0	+1
Pressão (MPa)	200	350	500
Tempo (minutos)	5	7,5	10

Os níveis de pressão e tempo que geraram adequada qualidade microbiológica e os maiores valores de atividade antioxidante e teores de compostos fenólicos foram utilizados para o tratamento das amostras.

## 10. Análises Microbiológicas

As amostras de suco foram diluídas serialmente em água peptonada estéril (0,1 %) ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  para o suco controle e  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  para o suco processado por APH), para a pesquisa de bactérias lácticas, bactérias heterotróficas, bolores e leveduras, coliformes a 35°C e *Salmonella sp* em ágar Man, Rogosa, Sharp (MRS), ágar padrão para contagem (APC), ágar batata dextrose (ABD) e meio de cultura ChromoCult®, respectivamente. Cem mililitros das amostras diluídas foram inoculadas em cada meio de cultura. O espalhamento da amostra foi realizado com alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 37 °C, durante 48 horas. As análises foram realizadas em duplicata.

## 11. Análise de Aceitação Sensorial

A análise de aceitação sensorial do suco de jabuticaba, pressurizado a 350 MPa por 7,5 minutos, foi realizada por um grupo de 80 avaliadores não-treinados (49 mulheres e 31 homens), de faixa etária entre 17 e 79 anos, que apresentassem o hábito de consumir sucos de frutas pelo menos uma vez na semana (**Anexo 6**). Foram recrutados funcionários, estudantes e visitantes da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foram avaliados os seguintes atributos: impressão global, aroma, sabor, aparência e textura utilizando uma escala não-estruturada de 9 cm, com a intensidade variando de 0 (“desgostei extremamente”) a 9 (“gostei extremamente”), e com o ponto central especificado em 4,5 cm (“não gostei, nem desgostei”) (**Anexo 7**). A intenção de compra foi avaliada por meio do emprego de escala nominal de cinco pontos, tendo como pontos de âncora superior e inferior as expressões “certamente não compraria” e “certamente compraria”, respectivamente, e como ponto central “talvez

compraria, talvez não compraria”, de acordo com a metodologia descrita por Meilgaard *et al.* (2006). Vinte e cinco mililitros do suco foram oferecidos a 10 °C, em copos plásticos com capacidade de 50 mL, codificados com números de três dígitos. As amostras foram apresentadas em ordem monádica seqüencial e balanceada (MacFie *et al.*, 1989), em que cada consumidor avaliou tanto o suco controle quanto o pressurizado.

## 12. Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. A comparação das médias foi realizada por análise de variância (Oneway ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey, e a comparação dos resultados das análises de aceitação sensorial foi realizada por teste-t pareado, utilizando o *software* GraphPad Prism para Windows, versão 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). A associação das variáveis estudadas foi avaliada por meio de correlação de Pearson, e a matriz de planejamento de experimentos foi gerada e analisada, utilizando o *software* Statistica, versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Os resultados foram considerados significativos quando  $p<0,05$ .

## Capítulo 1

**Bioactive compounds and chemical composition of  
jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and its fractions**

## 1. INTRODUCTION

The Brazilian Atlantic Rainforest is among the 35 environments on the planet considered as biodiversity hotspots due to their unique species associated and its higher risk of disappearance as a consequence of environmental degradation (Zachos & Habel, 2011). Among the threatened vegetal varieties found in the Atlantic Rainforest Brazilian berry jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) stands out.

Jabuticaba is a purple to black colored fruit with whitish sweet, slightly acid yet pulp. Due to its desirable sensory attributes (de Jesus *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2013), the fruit has great marketing potential, for producing juices, jams, jellies, vinegars, liqueurs and wines, as well as consumed fresh (Citadin *et al.*, 2010). Although jabuticaba is popular throughout Brazil, it does not have high economic value because of its high perishability, which hampers its commercialization (Agostini *et al.*, 2009).

Jabuticaba fruit presents high antioxidant activity and is rich in phenolic compounds, especially anthocyanins, being cyanidin-3-*O*-glucoside and delphinidin-3-*O*-glucoside the major compounds (Wu *et al.*, 2013). The presence of bioactive compounds with high antioxidant activity is associated with the health beneficial claims of berries consumption. Studies have demonstrated the beneficial effects of jabuticaba peel in health such as increase in plasma antioxidant activity and HDL cholesterol, as well as improvement on insulin resistance (Leite *et al.*, 2011; Lenquiste *et al.*, 2012) indicating that this fruit has a great potential to be considered as a functional food. However, there are few studies regarding the detailed composition of jabuticaba whole fruit and its fractions.

In addition to providing novel compositional data, a more comprehensive characterization of the nutrients and bioactive compounds presents in jabuticaba and its fractions (peel, seed and pulp) will allow assessing the technological potential of this fruit, contributing to the sustainable use of Brazilian Atlantic Rainforest native resources. Therefore, the aim of the present study was to determine the antioxidant activity and the detailed chemical composition of jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and its fractions, with emphasis on phenolic compounds, carotenoids, tocopherols and minerals.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Standards and chemicals

Standard solutions of 1,000 mg/L of Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Se, and Cd were purchased from Quimlab Química & Metrologia® (São Paulo, Brazil). Folin-Ciocalteau reagent, 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 2,2'-azino-bis (2-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, ( $\pm$ )-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), fluorescein, potassium phosphate, naringenin, rutin, myricetin, myricitrin, quercetin, kaempferol, and gallic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, vanillic, syringic, 2,4-dihydroxybenzoic, 3,4-dihydroxybenzoic, *p*-dihydroxybenzoic, 2-hydroxycinnamic, *trans*-cinnamic, hippuric, caffeic, ferulic, sinapic, *m*-coumaric, *p*-coumaric, 5-caffeoquinic, rosmarinic, benzoic, salicylic, 4-hydroxyphenylacetic acids and  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ - tocopherols were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sodium carbonate and aluminum chloride were purchased from Spectrum Chemical Manufacturing Corp. (Gardena, CA, USA). Iron (II) sulfate and L (+) ascorbic acid were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Cyanidin-3,5-di-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-galactoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-rutinoside, cyanidin, malvidin, delphinidin and pelargonidin were purchased from Indofine Chemical Co. (Hillsborough, NJ, USA). Carotenoids ( $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, lycopene, zeaxanthin and lutein) standards were isolated from carrot, tomato and corn by open column chromatography (Rodriguez-Amaya, 2001). All solvents were HPLC grade from Tedia (Fairfield, OH, USA). HPLC grade water (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout the experiments.

### 2.2 Samples

Samples of jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*, cv. Sabará) from Minas Gerais state, Brazil, were purchased during harvest period (October of 2012) at Rio de Janeiro's agricultural trading central. Fruits were selected, washed and sanitized in 100 ppm sodium hypochlorite solution during 15 min.

Jabuticaba pulp was separated in a horizontal depulper, yielding a residue composed of peel and seeds, which were manually separated. Jabuticaba whole fruit, pulp, peel, seeds and residue were lyophilized. All samples were stored at -20°C.

### **2.3 Proximate composition, pH and total soluble solids**

Moisture, protein, lipid, dietary fiber and ash contents of fruits and their fractions were determined in triplicate according to official methods (AOAC, 2000). Carbohydrate content was determined by difference from 100% of the total moisture, protein, lipid, and ash contents. Total soluble solids (TSS) and pH values of jabuticaba pulp were determined by official methods (AOAC, 2000). Energetic values were calculated from the contents of lipids (9 kcal/g), proteins (4 kcal/g) and carbohydrates (4 kcal/g) excluding dietary fiber.

### **2.4 Mineral composition**

Sample digestion was performed in triplicate according to official methods (AOAC, 2000). Briefly, lyophilized samples and oven-dried jabuticaba pulp were carbonized in a hot plate and subsequently ashed in a muffle at 450 °C for 6 hours. Then, ashes were moistened, solubilized with 1 mL of concentrated nitric acid, heated in a hot plate until complete drying and ashed in a muffle at 450 °C. This procedure was repeated until white ashes were obtained, which were dissolved in 10% nitric acid.

#### **2.4.1 Macrominerals determination**

Calcium, sulfur, phosphorus, iron, magnesium, manganese, potassium and sodium contents were determined using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES) with double vision configuration (axial and radial) (iCAP 6300 Thermo Scientific®, Cambridge, England), equipped with cyclonic spray chamber, MiraMist nebulizer (Mira Mist CE, Burgener Research Inc., Ontario, Canada), charge coupled-device detector (CCD) and iTEVA 2.0 operating software for data acquisition.

Fe ( $\lambda = 249.940$ ), K ( $\lambda = 769.896$ ), Mn ( $\lambda = 257.610$ ), Na ( $\lambda = 589.592$ ), P ( $\lambda = 213.618$ ) and S ( $\lambda = 182.034$ ) contents were determined on axial view and Ca ( $\lambda = 393.366$ ) and Mg ( $\lambda = 280.270$ ) contents on radial view. Analytical curves with six standard solutions

were used for calibration and quantification was performed by interpolation. The operating conditions of ICP-OES were 1200 W of incident power; 12 L/min of plasma gas flow; 1.0 L/min of auxiliary gas flow; 0.19 bar of nebulizer pressure; 50 rpm of rotation speed of the peristaltic pump during data acquisition; 1 s of integration.

#### **2.4.2 Microminerals determination**

Cadmium, cobalt, copper, chromium, manganese, nickel, zinc and selenium contents were determined using an inductively coupled plasma mass spectrometer (iCAP Qc, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with collision and reaction cells, sample cones, nickel skimmer, quartz double pass cyclonic spray chamber (baffled), Teflon® concentric nebulizer (FPA-ST), Peltier, quartz injector of 2.5 mm diameter, autosampler (ASX 520, CETAC Technologies, Omaha, Nebraska, USA) and Qtegra operating software (version 1.5.1189.1) for data acquisition.

The elements were determined in the form of isotopes  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$  and  $^{82}\text{Se}$  in standard mode. To correct the transport interferences in sample introduction and ionization, internal standardization was performed with the addition and monitoring of isotopes  $^{45}\text{Sc}$ ,  $^{73}\text{Ge}$ ,  $^{103}\text{Rh}$  and  $^{205}\text{Tl}$  at final concentration of 5 µg/L. Analytical curves with seven standard solutions were used for calibration and quantification was performed by interpolation. The operating conditions of ICP-MS were 1500 W of incident power; 14 L/min of plasma gas flow; 0.8 L/min of auxiliary gas flow; 10 ms of dwell time; 1 channel per unit mass.

#### **2.5 Carotenoids and tocopherols content by HPLC**

Extraction of samples was performed in triplicate, according to Gimeno *et al.* (2000) with some modifications. Lyophilized jabuticaba whole fruit (2 g) was extracted with 5 mL of methanol and 5 mL of hexane in an ultrasound bath for 5 min and vortexed for 1 min. After centrifugation (1,690 g, 10 min, 10 °C), the supernatant was collected and the residue re-extracted three times following the same procedure. Supernatants were combined, the solvent removed and the dry residue reconstituted in hexane.

The liquid chromatography system (Shimadzu®, Japan) included a quaternary pump LC-20AT, diode array (DAD) SPD-M20A and fluorescence RF-10AXL detector, system controller CBM-20A and degasser DGU-20A5. Chromatographic separation of carotenoids

and tocopherols was achieved using a normal phase silica column (5 µm, 250 mm × 4.6 mm, Zorbax®) and isocratic elution with hexane:isopropanol (99:1, v/v), with a flow rate of 1.0 mL/min. Carotenoids and tocopherols were monitored by DAD at 450 nm and 295 nm, respectively (Tan & Brzuszkiewicz, 1989).

Identification of analytes was performed by comparison with retention time and absorption spectrum of the respective standard. Quantification was performed by external calibration. Data were acquired by LC solution software (Shimadzu Corporation®, version 1.25, 2009).

## 2.6 Ascorbic acid content by HPLC

Jabuticaba pulp was centrifuged (11,300 g, 5 min) and the supernatant diluted with 2% potassium phosphate buffer adjusted to pH 2.32 with HCl. The liquid chromatography system (Shimadzu®, Japan) included a quaternary pump LC-20AT, automatic injector SIL-20AHT, diode array detector (DAD) SPD-M20A, system controller CBM-20A and degasser DGU-20A5. Chromatographic separation of ascorbic acid was achieved using a reverse phase column (C18, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm, Kromasil®) according to Paulo *et al.* (1999) with modifications. The mobile phase consisted of an isocratic elution of 2% potassium phosphate buffer with a flow rate of 0.4 mL/min and absorbance of 243 nm.

Identification of ascorbic acid was performed by comparison with retention time and absorption spectrum of the standard. Quantification was performed by external calibration. Data were acquired by LC solution software (Shimadzu Corporation®, version 1.25, 2009).

## 2.7 Total phenolics, total flavonoids and total monomeric anthocyanins contents by spectrophotometric methods

Extraction of samples, with the exception of jabuticaba pulp, was performed according to Rufino *et al.* (2010) with modifications. Samples were extracted with methanol 50% in an Ultraturrax extractor (T18 BASIC, IKA®) at 14,000 rpm for 1 min. After centrifugation (1,700 g, 10 min, 20 °C), the residue was re-extracted with methanol 50% and then with acetone:water:acetic acid (70:29.5:0.5, v/v/v) as many times as necessary to obtain a colorless supernatant. Supernatants were combined and filtered with paper filter (Whatman no. 1). Jabuticaba pulp was analyzed directly after centrifugation (11,300 g, 10 min). All extractions were performed in triplicate. Extracts were stored at -20 °C until analysis.

Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteau reagent assay, as described by Singleton *et al.* (1999). Two hundred  $\mu\text{L}$  of extract were mixed with 1400  $\mu\text{L}$  of Milli-Q water, 100  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteau reagent and 300  $\mu\text{L}$  of 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution. After homogenization, the mixture was allowed to stand at 40 °C for 30 min. The absorbance of the solution was measured at 765 nm using the Vitor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter (PerkinElmer®, Turku, Finland) and the quantification was performed using a gallic acid calibration curve. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per g on a dry weight basis (dwb). Each extract was analyzed in triplicate.

Total flavonoids content was determined by the spectrophotometric assay described by Taie *et al.* (2008). Five hundred  $\mu\text{L}$  of extract were mixed with 500  $\mu\text{L}$  of 2%  $\text{AlCl}_3$ . After 1 h at room temperature, the absorbance of the mixture was measured at 405 nm. Quantification was performed using C3G (cyanidin-3-*O*-glucoside) calibration curves. Results were expressed as mg of C3G equivalents per g on dwb. Each extract was analyzed in triplicate.

Total monomeric anthocyanins content was determined by the pH differential method described by de Souza *et al.* (2014). Briefly, extracts were mixed with pH 1.0 and pH 4.5 aqueous buffers at the same dilution. The absorbance at each pH was measured at 510 nm and 700 nm. Quantification was performed using the following formula:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5} \quad (1)$$

$$TMA = (A \times MW \times df \times 1000) / \varepsilon \quad (2)$$

where A is the absorbance, MW is the molecular weight of C3G (449 g/mol), df is the dilution factor, and  $\varepsilon$  is the molar extinction coefficient of C3G (29,600 L/mol.cm).

Results were expressed as C3G equivalents per g on dwb. Each extract was analyzed in triplicate.

## 2.8 Antioxidant activity

The antioxidant activity of the extracts aforementioned was determined by FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) assays.

The FRAP assay was performed according to Benzie & Strain (1996) with slight modifications. FRAP reagent was prepared by mixing 2 mL of 10mM TPTZ solution in 6N

HCl 2 mL of 20 mM FeCl<sub>3</sub> solution and 20 mL of 300 mM acetate buffer (pH 3,6) and warmed to 37 °C prior to analysis. Twenty µL of extract were pipetted into a 96-well microplate, which was placed in the Vitor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter with automatic injector. 180 µL of FRAP reagent were automatically dispensed into each well, the plate was shaken and allowed to stand at 37 °C for 6 min. The absorbance was then read at 595 nm. Quantification was performed using a calibration curve prepared with FeSO<sub>4</sub>. Results were expressed as mmol of Fe<sup>+2</sup> equivalents per g dwb. Each extract was analyzed in triplicate.

The TEAC assay was performed according to Re, Pellegrini & Proteggente (1999) with slight modifications. The ABTS radical cation stock solution was generated by reacting K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> and ABTS for 12 to 16 h prior to use. ABTS radical cation stock solution was diluted (1:50) to an absorbance of 0.70±0.02 at 720 nm. Ten µL of extract were pipetted into a 96-well microplate, which was placed in the Vitor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter with automatic injector. ABTS radical cation solution (190 µL) were automatically dispensed into each well, the plate was shaken and allowed to stand at 37 °C for 6 min. Sample absorbance was read at 720 nm and subtracted from solvent blank absorbance. Quantification was performed using a calibration curve prepared with Trolox. Results were expressed as mmol of Trolox equivalents per g dwb. Each extract was analyzed in triplicate.

The ORAC assay was performed according to Zulueta *et al.* (2009) with slight modifications. 100 µL of extract and 100 µL of fluorescein solution (7.8 µM) were pipetted into a 96-well microplate, which was placed in the Vitor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter with automatic injector. Fifty µL of AAPH solution (221 mM) were automatically dispensed into each well, the plate was shaken and fluorescence was read at 485 nm excitation and at 535 nm emission using cycles of 30 seconds between readings until fluorescence loss. Quantification was performed using the difference between the areas under the curve of sample and blank. A calibration curve was prepared using Trolox and results were expressed as mmol of Trolox equivalents per g dwb. Each extract was analyzed in triplicate.

## **2.9 Phenolic compounds content by HPLC-DAD**

### *Extraction*

For anthocyanin analysis, the same extracts used for spectrophotometric analyses were employed.

The extraction of free and conjugated non-anthocyanin phenolic compounds in jabuticaba fruit was performed in triplicate, according to the adapted methodology of Dinelli

*et al.* (2011). For free phenolic compounds, 1 g of lyophilized samples (jabuticaba whole fruit, peel, seed and residue) and 10 g of fresh jabuticaba pulp were extracted for 10 min with 20 mL of cold ethanol 80% and centrifuged (2500 g, 5 min, 10 °C). The supernatant was collected and the residue re-extracted. Supernatants were combined, the solvent removed and the dry residue was reconstituted in water.

For alkaline hydrolysis, the free phenolic compounds extraction residue was incubated with 12 mL of water and 5 mL of NaOH (10 M) at room temperature in the dark for 16 hours with agitation. After this period, the pH was adjusted to 2 and the mixture was extracted for 30 seconds with 15 mL of ethyl acetate. After centrifugation (2500 g, 5 min, 10 °C), the supernatant was collected and the extraction with ethyl acetate repeated twice. Supernatants were combined, the solvent removed and the dry residue was reconstituted in methanol 80%.

For acid hydrolysis, the alkaline hydrolysis extraction residue was incubated with 2.5 mL of concentrated HCl at 85 °C for 30 minutes. Then, the extraction with ethyl acetate described for alkaline hydrolysis was performed. All extracts were filtered through a 0.45 µm cellulose ester membrane (Millipore®, Brazil) prior to HPLC analysis.

#### *Chromatographic conditions*

The liquid chromatography system (Shimadzu®, Japan) included a quaternary pump LC-20AT, automatic injector SIL-20AHT, diode array detector (DAD) SPD-M20A, system controller CBM-20A and degasser DGU-20A5.

Chromatographic separation of anthocyanins was achieved using a reverse phase column C18 (5 µm, 250 mm × 4.6 mm, Kromasil®). The mobile phase consisted of a gradient of 1% aqueous formic acid (eluent A), 1% formic acid in methanol (eluent B) and acetonitrile (eluent C), with a flow rate of 2.0 mL/min. Eluent C concentration was kept constant at 2% during analysis. Prior to injection, the column was equilibrated with 18% B. After injection of sample, this proportion was kept constant until 2 min, increased to 32% B in 6 min and to 52% B in 8 min, and then decreased to 18% B in 18 min. Between injections, 10 min intervals were used to re-equilibrate the column with 18% B. Anthocyanins were monitored by DAD at 530 nm.

Chromatographic separation of non-anthocyanin phenolic compounds was achieved using a reverse phase column C18 (5 µm, 250 mm × 4.6 mm, Phenomenex®). The mobile phase consisted of a gradient of 0.3% aqueous formic acid (eluent A), methanol (eluent B) and acetonitrile (eluent C), with a flow rate of 1.0 mL/min. Eluent C concentration was kept

constant at 1% during analysis. Prior to injection, the column was equilibrated with 18% B. After injection of sample, this proportion was increased to 20% B in 1 min, 43% B in 18 min, 85% in 23 min and kept constant until 30 min. Between injections, 10 min intervals were used to re-equilibrate the column with 18% B. Non-anthocyanins phenolic compounds were monitored by DAD from 190 to 370 nm.

Identification of analytes was performed by comparison with retention time and absorption spectrum of the respective standard. Quantification was performed by external calibration. Data were acquired by LC solution software (Shimadzu Corporation®, version 1.25, 2009).

## 2.10 Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison post-test was performed for comparing means using GraphPad Prism software for Windows, version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). Pearson correlation analysis was performed to evaluate associations between variables using Statistica software, version 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Results were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Proximate composition, total soluble solids and pH values

Jabuticaba fractions, mainly the pulp, exhibited high moisture contents (90.7%) (**Table 1**). Similar results were found in the literature by Lima *et al.* (2008) and Dessimoni-Pinto *et al.* (2011) (85.0% and 88.8%, respectively). Whole fruit and pulp presented both approximately 12° Brix, indicating that the pulp is the main contributor to the fruit TSS, in accordance with previous data in the literature (Lima *et al.*, 2008; Moreno 2010). Indeed, Lima *et al.* (2011) reported high contents of total sugars in jabuticaba pulp (75 g/100g dwb) which was responsible for the fruit sweet taste and great potential for juice production.

**Table 1.** Proximate composition, total soluble solids and pH values of jabuticaba fruit and its fractions<sup>1</sup>.

	<b>Whole Fruit</b>	<b>Pulp</b>	<b>Peel</b>	<b>Seed</b>	<b>Residue</b>
<b>Moisture (%)</b>	87.4±0.2 <sup>b</sup>	90.7±6.2 <sup>a</sup>	80.9±0.2 <sup>c</sup>	58.0±0.2 <sup>e</sup>	76.6±1.9 <sup>d</sup>
<b>Ash (%)</b>	3.1±0.0 <sup>b</sup>	3.2±0.2 <sup>b</sup>	4.0±0.0 <sup>a</sup>	2.4±0.0 <sup>c</sup>	4.2±0.1 <sup>a</sup>
<b>Lipid (%)</b>	1.8±0.0 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>d</sup>	0.6±0.0 <sup>b</sup>	0.6±0.0 <sup>b</sup>	0.5±0.0 <sup>c</sup>
<b>Protein (%)</b>	5.0±0.1 <sup>c</sup>	3.5±0.0 <sup>d</sup>	8.5±0.0 <sup>a</sup>	7.1±0.2 <sup>b</sup>	7.5±0.2 <sup>b</sup>
<b>Carbohydrate (%)</b>	90.1±0.1 <sup>b</sup>	93.1±0.2 <sup>a</sup>	86.9±0.3 <sup>d</sup>	89.8±0.3 <sup>b</sup>	87.9±0.0 <sup>c</sup>
<b>Dietary fiber (%)</b>	38.2±0.6 <sup>a</sup>	ND <sup>2</sup>	38.4±1.2 <sup>a</sup>	31.8±0.7 <sup>b</sup>	36.1±0.7 <sup>a</sup>
<b>Energetic value (kcal/100g)</b>	244	388	233	266	242
<b>pH</b>	3.6±0.0 <sup>b</sup>	3.3±0.0 <sup>d</sup>	3.3±0.0 <sup>d</sup>	4.1±0.0 <sup>a</sup>	3.4±0.0 <sup>c</sup>
<b>TSS (° Brix)</b>	11.8±0.0	12.0±0.0	NQ <sup>3</sup>	NQ	NQ

<sup>1</sup>Results expressed on a dwb as mean±SD for triplicates. Different letters in the line indicate significantly difference between fractions of the same fruit (One-way ANOVA with Tukey *post hoc*),  $p < 0.05$ . <sup>2</sup>Non detected. <sup>3</sup>Non quantified.

Jabuticaba fractions presented low pH values (3.3 to 4.1), in accordance with literature data (Lima *et al.*, 2008; Moreno, 2010; Dessimoni-Pinto *et al.*, 2011). In these acidic conditions anthocyanins pigments are stable and show their greatest color, from slightly bluish to red (Fennema, 1996). Moreover, low pH values can inhibit the growth of most pathogenic microorganisms (Brackett & Splittstoesser, 1992).

Jabuticaba fruit and its fractions showed low lipid content, ranging from 0.19% to 1.81%, in accordance with values reported in the literature (Lima *et al.*, 2008; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Alezandro *et al.*, 2013). The residue and peel presented high ash contents, in accordance with values reported in the literature for the different fractions (Lima *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2011; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Alezandro *et al.*, 2013).

The highest protein amounts were found for jabuticaba peel (8.5%), seed (7.1%) and residue (7.5%). Our results were higher than those reported in the literature of 0.97 to 5.77% (Lima *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2011; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Alezandro *et al.*, 2013). Jabuticaba fractions also presented high contents of dietary fiber, ranging from 31.8% to 38.4%. The consumption of 100 g of fresh jabuticaba whole fruit would provide approximately 17% of the recommended daily intake of total fiber for adults (IOM, 2005). No dietary fibers were found in jabuticaba pulp.

In general, all fractions presented high contents of carbohydrates (86.9% to 93.1%). Despite dietary fiber was not detected at jabuticaba pulp, this fraction is known to present high contents of total sugars (Lima *et al.*, 2011). In addition, these authors also found high amounts of sugars in the peel and seed. This could be related to the presence of pulp sugars that remained attached to these fractions or due to the fact that in general seeds present high amounts of starch as energy reserve for the plant development (Hellmann *et al.*, 2008).

In relation to energetic values, according to Brazilian's population food guide (Brasil, 2005), 200 mL of fresh jabuticaba pulp corresponds to one fruit serving of 70 kcal, which represents only 3.5% of the energy daily intake based on a 2000 kcal diet, and is lower than those reported for usually consumed fruit juices like cashew apple (100 kcal), apple (100 kcal), grape (120 kcal) and orange (130 kcal) (Franco, 2005).

### **3.2 Mineral Composition**

In general, mineral contents of jabuticaba fruit and its fractions (**Table 2**) are in accordance to literature with only some discrepancies. Our results for potassium, sodium, copper, manganese and calcium were similar to those found in literature (Lima *et al.*, 2011; Alezandro *et al.*, 2013). On the other hand, iron contents were 87% higher than those reported by these authors. These differences may be related to variations in plant cultivar, soil, weather, agricultural practices and ripeness stage (de Souza *et al.*, 2014).

**Table 2.** Mineral contents in 100 g of jabuticaba and its fractions<sup>1</sup>

<b>Element</b>	<b>Whole Fruit</b>	<b>Peel</b>	<b>Seed</b>	<b>Pulp</b>	<b>Residue</b>
<b>Ca (mg)</b>	27.1±2.6 <sup>c</sup>	51.0±0.8 <sup>b</sup>	17.1±2.7 <sup>d</sup>	67.4±1.5 <sup>a</sup>	46.3±2.9 <sup>b</sup>
<b>Fe (mg)</b>	23.7±1.3 <sup>b</sup>	3.6±0.3 <sup>d</sup>	1.3±0.2 <sup>e</sup>	32.8±0.8 <sup>a</sup>	9.8±0.3 <sup>c</sup>
<b>P (mg)</b>	75.7±8.8 <sup>c</sup>	89.0±8.7 <sup>c</sup>	95.1±5.8 <sup>bc</sup>	176.6±6.8 <sup>a</sup>	111.2±8.6 <sup>b</sup>
<b>K (mg)</b>	700.7±81.2 <sup>d</sup>	1006.0±29.5 <sup>b</sup>	401.2±70.4 <sup>e</sup>	1978.5±174.0 <sup>a</sup>	806.9±12.9 <sup>cd</sup>
<b>Na (mg)</b>	23.3±0.9 <sup>d</sup>	60.7±2.0 <sup>b</sup>	38.3±5.6 <sup>cd</sup>	153.6±11.0 <sup>a</sup>	46.0±6.2 <sup>bc</sup>
<b>Mn (mg)</b>	1.1±0.12 <sup>b</sup>	1.0±0.1 <sup>b</sup>	0.4±0.1 <sup>c</sup>	2.3±0.2 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>b</sup>
<b>Mg (mg)</b>	72.3±7.6 <sup>bc</sup>	65.4±1.2 <sup>cd</sup>	51.3±8.0 <sup>d</sup>	187.9±7.2 <sup>a</sup>	85.3±4.0 <sup>b</sup>
<b>S (mg)</b>	31.0±3.4 <sup>c</sup>	66.9±8.8 <sup>a</sup>	35.1±3.3 <sup>c</sup>	57.1±8.5 <sup>ab</sup>	45.7±2.9 <sup>bc</sup>
<b>Zn (mg)</b>	1.1±0.2 <sup>bc</sup>	1.3±0.1 <sup>b</sup>	0.8±0.2 <sup>c</sup>	3.1±0.1 <sup>a</sup>	1.3±0.2 <sup>b</sup>
<b>Cu (mg)</b>	0.8±0.2 <sup>b</sup>	0.6±0.1 <sup>b</sup>	0.5±0.1 <sup>b</sup>	1.8±0.4 <sup>a</sup>	0.5±0.0 <sup>b</sup>
<b>Ni (mg)</b>	2.8±0.2 <sup>b</sup>	0.2±0.0 <sup>d</sup>	0.1±0.0 <sup>d</sup>	3.9±0.0 <sup>a</sup>	0.9±0.0 <sup>c</sup>
<b>Co (μg)</b>	30.0±3.4 <sup>b</sup>	2.7±0.2 <sup>d</sup>	0.9±0.2 <sup>d</sup>	37.2±1.5 <sup>a</sup>	8.9±0.5 <sup>c</sup>
<b>Se (μg)</b>	1.9±0.2 <sup>a</sup>	1.2±0.3 <sup>a</sup>	1.2±0.1 <sup>a</sup>	3.4±1.5 <sup>a</sup>	3.1±0.3 <sup>a</sup>
<b>Cd (μg)</b>	1.0±0.0 <sup>b</sup>	1.2±0.2 <sup>b</sup>	0.9±0.1 <sup>b</sup>	2.5±0.5 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Results expressed on a dwb as mean±SD for triplicates. Different letters in the column indicate significantly difference between fractions of the same fruit (Oneway ANOVA with Tukey *post hoc*),  $p < 0.05$ .

Jabuticaba pulp, the main edible part of the fruit, presented the highest contents of most minerals and may be considered a nutritional source of manganese, copper and iron (**Table 3**). These minerals are essential micronutrients and participate in various biochemical activities in the human organism (Venezuela, 2001). Although there are no Recommended Daily Allowance (RDA) values for cobalt, this mineral is also considered an essential micronutrient and its function is related to the composition of vitamin B<sub>12</sub> (Yamada, 2013).

Although copper may be considered a toxic metal, it is involved in human metabolism at low concentrations (FAO/WHO, 1998). Fruits, wheat bran and germ, vegetables, honey and coffee, are examples of foods that contain copper. As aforementioned, 200 mL of jabuticaba pulp corresponds to one fruit serving of 70 kcal. Fresh jabuticaba pulp contains 0.31 mg of copper/200 mL, equivalent to 34.3% of the RDA for adults (**Table 3**). Thus, the fruit has adequate amounts of copper and offers no danger of intoxication.

Despite iron bioavailability from vegetable foods being generally lower than from animal sources (Fennema, 1996), the iron content found for jabuticaba pulp (6.0 mg/100 g fwb) is much higher than that of well-known vegetable iron-rich foods, such as baked beans

(1.5 mg/100 g fwb) and cabbage (0.5 mg/100 g fwb). The consumption of 200 mL of fresh jabuticaba pulp represents 70.3% and 31.2% of the RDA for males and females adults, respectively. Considering the high prevalence of anemia in Brazil (53%), this fruit could be used as a valuable tool to recover iron deficiency (Jordão *et al.*, 2009).

**Table 3.** Percentage of Recommended Dietary Allowances (RDA) or Adequate Intakes (AI) of minerals for male and female adults (19–51 years) based on 200 mL of fresh jabuticaba pulp.

<b>Element</b>	<b>% of RDA orAI</b>	
	<b>Males</b>	<b>Females</b>
<b>Ca</b>	1.2	1.2
<b>Fe</b>	70.3	31.2
<b>P</b>	4.3	4.3
<b>K</b>	7.2	7.2
<b>Na</b>	1.8	1.8
<b>Mn</b>	17.1	21.9
<b>Mg</b>	7.9	10.2
<b>Zn</b>	4.8	6.6
<b>Cu</b>	34.3	34.3
<b>Se</b>	1.1	1.1

Cadmium and nickel can exert toxic actions in the organism. The Brazilian legislation establishes a maximum limit of tolerance of 1.0 mg/kg of cadmium for fish and fish products on a fresh basis (Brasil, 1998), much higher than the content found in the present work, which suggests that cadmium toxicity would not be a risk, and there is no maximum limit of tolerance for nickel (de Jesus *et al.*, 2008).

Jabuticaba fruit and its fractions present very low concentrations of selenium and are not considered as a source of this mineral. The high iron and manganese levels may be explained by the composition of the Brazilian soil, which is typically acidic, with low levels of phosphorus, calcium, potassium and magnesium and high contents of aluminum, manganese and iron (de Souza *et al.*, 2014). As reported by Lima *et al.* (2011), potassium was the most abundant mineral in jabuticaba pulp. Although its contribution to RDA may be considered low (7.2% for 200 mL of pulp), other fruits recognized to be sources of potassium such as guava and orange show similar contributions to RDA (8.4% and 7.0% of RDA for 200g of fruit, respectively) (TACO, 2011).

### 3.3 Ascorbic acid, carotenoids and tocopherols determined by HPLC

Jabuticaba pulp presented low contents of ascorbic acid ( $8.1 \pm 0.7$  mg/100 mL fwb). Our results were on average 65% lower than those described in literature for this fruit and other berries, such as bayberry, cactus berry and Chilean berries (Abe *et al.* 2011; Lima *et al.* 2011; TACO, 2011; Herrera-Hernández *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013). However, this compound was not detected in blackberry purées (Patras *et al.*, 2009). The variability of ascorbic acid contents could be related to losses during harvest, depulping process, transport and storage.

Of all available carotenoids standards ( $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein and zeaxanthin),  $\beta$ -carotene was the only carotenoid identified and quantified in jabuticaba whole fruit ( $873.2 \pm 26.6$  µg/100 g dwb). As far as we know, this is the first report on the carotenoid profile of jabuticaba. Our results were much higher than the literature reports of  $\beta$ -carotene contents for Bulgarian blackberries (100 µg/100 g dwb) (Marinova & Ribarova, 2007) and as in the present study, these authors did not detect lycopene in any of the analyzed berries. According to classification sources of carotenoids proposed by Britton & Khachik (2009), jabuticaba whole fruit can be considered a moderate source of  $\beta$ -carotene (110 µg/100 g fwb) on a scale of 100 – 500 µg/100 g fwb.

Jabuticaba fruit contained  $\alpha$ - and  $\beta$ -tocopherols ( $7.2 \pm 0.4$  and  $1.5 \pm 0.2$  µg/g dwb, respectively). The identification of these compounds was confirmed via coelution with the authentic standards as well as comparison to their absorption spectrum. To the best of our knowledge, this is the first study to report tocopherols contents in jabuticaba. However, our results were lower than those described in literature for other berries, which could partially be related to the low lipid contents found for jabuticaba in this study, since tocopherols are lipophilic compounds. Darnet *et al.* (2011) measured tocopherols in açaí pulp and identified  $\alpha$ -tocopherol (394.3 µg/g),  $\beta + \gamma$ -tocopherol (10.2 µg/g) and Carvalho *et al.* (2013) analyzed different varieties of raspberries and found  $\alpha$ - (7.5 to 20.9 µg/g dwb),  $\gamma$ - (54 to 197 µg/g dwb) and  $\delta$ - (52 to 149 µg/g dwb) tocopherols.

### 3.4 Total phenolics, total flavonoids and total monomeric anthocyanins contents by spectrophotometric methods

Total phenolic, total flavonoids and total anthocyanins for jabuticaba fruit and its fractions are presented in **Table 4**. Jabuticaba peel showed the highest contents of total phenolic compounds (121.0 mg GAE/g), flavonoids (16.5 mg C3G/g) and anthocyanins (14.3 mg C3G/g), as expected since the synthesis of these compounds is increased under stress conditions as infections, injuries, UV radiation, among others. Thus, the greater exposure of the peel to these adverse conditions, results in higher production of these antioxidants (Angelo & George, 2007). However, jabuticaba whole fruit, seed and residue also stood out by the high levels of phenolic compounds.

**Table 4.** Total phenolic, flavonoids and anthocyanins contents in jabuticaba fruit and its fractions<sup>1</sup>.

	Total Phenolics (mg GAE/g dwb) <sup>2</sup>	Total Flavonoids (mg C3G/g dwb) <sup>3</sup>	Total Anthocyanins (mg C3G/g dwb) <sup>3</sup>
Whole Fruit	59.6±1.1 <sup>d</sup>	10.4±0.5 <sup>b</sup>	2.98±0.2 <sup>c</sup>
Pulp	5.66±0.1 <sup>e</sup>	0.38±0.0 <sup>e</sup>	ND <sup>4</sup>
Peel	121.0±1.6 <sup>a</sup>	16.5±1.4 <sup>a</sup>	14.3±1.2 <sup>a</sup>
Seed	106.7±1.0 <sup>b</sup>	0.89±0.0 <sup>d</sup>	0.99±0.0 <sup>d</sup>
Residue	89.7±2.2 <sup>c</sup>	6.33±0.5 <sup>c</sup>	9.01±0.5 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Results expressed in dry matter as mean±SD for triplicates. Different letters in the column indicate significantly difference between fractions (One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test),  $p < 0.05$ . <sup>2</sup>GAE = gallic acid equivalents, <sup>3</sup>C3G = cyanidin-3-*O*-glucoside equivalents, <sup>4</sup>Not detected.

Similar results for total phenolics were observed in the literature for different jabuticaba fractions (4.9 to 119.9 mg GAE/g dwb) (Lima *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2014). The whole fruit presented higher levels of these compounds than those reported for phenolic-rich fruits, such açaí (32.7 mg GAE/g dwb) and other berries like blueberry (24.7 mg GAE/g dwb), raspberry (23.17 mg GAE/g dwb) and red raspberry (31.4 mg GAE/g dwb) (Kang *et al.*, 2012; de Souza *et al.*, 2014). Although some studies in the literature reported larger amounts of flavonoids in fruits, their results were expressed in catechin equivalents, which hamper the comparison (Rufino *et al.*, 2010).

The total monomeric anthocyanins content of jabuticaba peel is in accordance with literature data (15.2 mg/g dwb) (Leite-Legatti *et al.*, 2012). Anthocyanins were not found in jabuticaba pulp probably due to the low sensitivity of the method. It is worth mentioning that jabuticaba peel and residue showed higher amounts of anthocyanins than those reported in the literature for blackberry (4.8 mg C3G/g), açaí (from 2.6 to 3.0 mg C3G/g), blueberry (2.3 mg C3G/g), strawberry (2.2 mg C3G/g), cherry (2.0 mg C3G/g) and red raspberry (1.3 mg C3G/g) (Bobbio *et al.* 2000; de Rosso *et al.* 2008; de Souza *et al.*, 2014).

### 3.5 Phenolic compounds content by HPLC-DAD

Phenolic compounds occur in plants in free and conjugated forms (León-González *et al.* 2013). However, bound phenolics are not extractable by organic solvents, since the ester and glycosidic bonds between phenolic acids and cell wall polymers are not hydrolyzed by these solvents (Pajak *et al.* 2014). Thus, in our study we used an extraction method entailing alkaline and acid hydrolyzes that enables the phenolic compounds release. Alkaline hydrolysis breaks the ester bond between phenolic acids and cell wall polysaccharides, whereas acid hydrolysis cleaves glycosidic bonds (Acosta-Estrada *et al.* 2014).

In this study, phenolic compounds contents of jabuticaba were determined by spectrophotometric and HPLC methods, because despite the first exhibits lower sensibility, it is more widely reported in the literature. Phenolic acids (*i. e.* gallic, *m*-coumaric and protocatechuic acids) and flavonoids (*i. e.* cyanidin-3-*O*-glucoside, rutin, myricetin and quercetin) were identified in jabuticaba (**Table 5**). Other peaks were observed in the chromatograms but they could not be identified due to lack of standards. One of these unidentified peaks was detected at 530 nm, suggesting it was an additional anthocyanin. Indeed, according to literature data, two anthocyanins are present in jabuticaba: cyanidin-3-*O*-glucoside and delphinidin-3-*O*-glucoside (Reynertson *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2011; Leite-Legatti *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Therefore, it is very likely that the unidentified anthocyanin is delphinidin-3-*O*-glucoside, which will be confirmed by further analysis with the commercial standard.

**Table 5.** Phenolic compounds contents ( $\mu\text{g/g dwb}$ ) in jabuticaba fruit and its fractions<sup>1</sup>.

<b>Compound</b>	<b>Extract</b>	<b>Whole fruit</b>	<b>Pulp</b>	<b>Peel</b>	<b>Seed</b>	<b>Residue</b>
Gallic acid		54±1 <sup>d</sup>	22.0±0.3 <sup>e</sup>	143±5 <sup>c</sup>	206±6 <sup>b</sup>	275±11 <sup>a</sup>
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside		2,799±176 <sup>c</sup>	4.4±0.0 <sup>e</sup>	12,613±184 <sup>a</sup>	575±36 <sup>d</sup>	7,070±315 <sup>b</sup>
Rutin		279±8 <sup>c</sup>	25±2 <sup>d</sup>	867±16 <sup>a</sup>	864±44 <sup>a</sup>	682±29 <sup>b</sup>
Myricetin	Free Phenolics	4.3±0.4 <sup>c</sup>	1.9±0.1 <sup>c</sup>	43±2 <sup>a</sup>	19.7±0.7 <sup>b</sup>	21.0±0.3 <sup>b</sup>
Quercetin		7.5±0.2 <sup>c</sup>	ND <sup>2</sup>	159±1 <sup>a</sup>	7.8±0.8 <sup>c</sup>	59.0±0.9 <sup>b</sup>
<i>m</i> -coumaric acid		5.4±0.5 <sup>bc</sup>	9.4±0.3 <sup>a</sup>	3.8±0.2 <sup>c</sup>	8.8±1.4 <sup>a</sup>	7.6±0.0 <sup>ab</sup>
<b>Subtotal</b>		<b>3,150±185<sup>c</sup></b>	<b>63±3<sup>e</sup></b>	<b>13,819±250<sup>a</sup></b>	<b>1,681±30<sup>d</sup></b>	<b>8,115±319<sup>b</sup></b>
Gallic acid		919±9 <sup>c</sup>	ND	833±110 <sup>c</sup>	2,379±40 <sup>b</sup>	3,533±216 <sup>a</sup>
Protocatechuic acid	Alkaline hydrolysis	44±5 <sup>c</sup>	ND	139±10 <sup>a</sup>	ND	85±2 <sup>b</sup>
Myricetin		3.7±0.2 <sup>b</sup>	6.8±2.7 <sup>b</sup>	2.4±0.3 <sup>b</sup>	21.2±1.9 <sup>a</sup>	4.0±0.0 <sup>b</sup>
<b>Subtotal</b>		<b>967±14<sup>c</sup></b>	<b>6.8±2.7<sup>d</sup></b>	<b>974±121<sup>c</sup></b>	<b>2,400±41<sup>b</sup></b>	<b>3,627±163<sup>a</sup></b>
Gallic acid		433±21 <sup>a</sup>	8.9±0.6 <sup>e</sup>	63±4 <sup>d</sup>	323±3 <sup>b</sup>	98±5 <sup>c</sup>
Myricetin	Acid hydrolysis	ND	ND	5.5±0.4 <sup>a</sup>	3.6±0.5 <sup>a</sup>	3.2±0.9 <sup>a</sup>
Quercetin		ND	ND	ND	ND	ND
<b>Subtotal</b>		<b>433±21<sup>a</sup></b>	<b>8.9±0.6<sup>e</sup></b>	<b>68±4<sup>d</sup></b>	<b>326±3<sup>b</sup></b>	<b>102±4<sup>c</sup></b>
<b>Total</b>		<b>4,550±184<sup>c</sup></b>	<b>78±2<sup>d</sup></b>	<b>14,862±125<sup>a</sup></b>	<b>4,408±21<sup>c</sup></b>	<b>11,843±229<sup>b</sup></b>

<sup>1</sup>Results expressed as mean±SD for triplicates. Different letters in the line indicate significantly difference between fractions of the same fruit (Oneway ANOVA with Tukey *post hoc* test),  $p<0.05$ . <sup>2</sup>Not detected.

Our results of anthocyanins content were similar to those described for jabuticaba in literature (Wu *et al.*, 2012). Gallic and protocatechuic acids as well as myricetin, quercetin, rutin and cyanidin-3-*O*-glucoside were also reported in literature for other berries and their products (Gordon *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Díaz-García *et al.*, 2013; León-González *et al.*, 2013).

As far as we know, this is the first report of protocatechuic and *m*-coumaric acids in jabuticaba (Reynertson *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2014; de Castro *et al.*, 2014). Wu *et al.* (2012) used HPLC-DAD-MS and identified other 19 phenolic compounds in jabuticaba fruit. However, differently from the present study in which we used original standards for quantification, these authors quantified all the identified phenolic compounds using calibration curves of gallic acid, jaboticabin or quercetin, which leads to less accurate results.

In total, jabuticaba peel showed the highest total phenolic compounds content (14.9 mg/g dwb), followed by the residue (11.8 mg/g dwb), whole fruit (4.6 mg/g dwb), seed (4.4 mg/g dwb) and pulp (0.1 mg/g dwb). Free phenolic compounds were predominant in the pulp (81%), peel (93%), residue (69%) and whole fruit (69%) and the conjugated forms were mainly found in the seed (61%).

Cyanidin-3-*O*-glucoside, rutin and *m*-coumaric acid were found exclusively as free compounds in the samples. After alkaline hydrolysis, protocatechuic acid was found in whole fruit, peel and residue. Although gallic acid was found in the free form in all samples, this compound was predominantly conjugated in jabuticaba, with up to 25 times higher contents in conjugated forms in comparison to the free form (whole fruit). Cyanidin-3-*O*-glucoside was the most abundant phenolic compound in jabuticaba peel, residue and whole fruit (85%, 60% and 62%, respectively), while in jabuticaba seed gallic acid was predominant (54%).

### **3.6 Antioxidant activity**

Antioxidant activity of jabuticaba fruit and its fractions evaluated by FRAP, TEAC and ORAC assays are shown in **Table 6**. Jabuticaba peel presented the highest antioxidant activity (AA) independently of the method used. However, there was no statistically difference in AA by TEAC assay between jabuticaba peel, seed and residue. Of all the fractions analyzed, the pulp showed the lowest AA, which was to be expected, since this fraction had the lowest amounts of bioactive compounds.

**Table 6.** Antioxidant activity measured by FRAP, ORAC and TEAC assays in jabuticaba fruit and its fractions<sup>1</sup>.

	<b>FRAP</b> (mmol Fe <sup>+2</sup> /g)	<b>ORAC</b> (mmol Trolox/g)	<b>TEAC</b> (mmol Trolox/g)
Whole Fruit	0.73±0.0 <sup>d</sup>	0.37±0.0 <sup>c</sup>	0.42±0.0 <sup>b</sup>
Pulp	0.05±0.0 <sup>e</sup>	0.06±0.0 <sup>d</sup>	0.05±0.0 <sup>c</sup>
Peel	1.96±0.0 <sup>a</sup>	0.77±0.1 <sup>a</sup>	0.95±0.0 <sup>a</sup>
Seed	1.88±0.0 <sup>b</sup>	0.61±0.0 <sup>b</sup>	0.96±0.0 <sup>a</sup>
Residue	1.63±0.1 <sup>c</sup>	0.65±0.1 <sup>a,b</sup>	0.96±0.0 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Results expressed in dry weight basis as mean±SD for triplicates. Different letters in the column indicate significantly difference between fractions (One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test), *p* < 0.05.

The results of AA found at the present study for FRAP assay of jabuticaba fruit (0.73 mmol Fe<sup>+2</sup>/g), were slightly higher than those reported in the literature by Rufino *et al.* (2010) (0.64 mmol Fe<sup>+2</sup>/g). However, these authors used the fruits without seeds and in our study we found that the seed has high AA (1.88 mmol Fe<sup>+2</sup>/g). Furthermore, jabuticaba presented higher AA in comparison to berries recognized by elevated AA such as açaí (0.22 mmol Fe<sup>+2</sup>/g), jambolão (0.17 mmol Fe<sup>+2</sup>/g), blackberry (0.16 mmol Fe<sup>+2</sup>/g), strawberry (0.14 mmol Fe<sup>+2</sup>/g) and raspberry (0.091 mmol Fe<sup>+2</sup>/g) (Rufino *et al.*, 2010; Henríquez *et al.*, 2011).

Regarding the ORAC assay, our results were 27% higher than those found by Batista *et al.* (2014) for jabuticaba peel non-hydrolyzed and hydrolyzed extracts (0.52 and 0.61 mmol Trolox/g, respectively). As observed for FRAP, the ORAC values of the present study were higher than those described by Wolfe *et al.* (2008) for strawberry, blueberry, cherry, plum, raspberry and pomegranate (0.045 to 0.084 mmol Trolox/g).

Considering the TEAC assay, our results were similar to those described by Lima *et al.* (2008) for seed (1.1 mmol Trolox/g) and on average 55% lower than those reported by the same authors for jabuticaba whole fruit, peel and pulp (1.2; 2.1; 0.1 mmol Trolox/g, respectively). As aforementioned for the FRAP assay, the results found for jabuticaba whole fruit were slightly higher than those described in the literature by Rufino *et al.* (2010) (0.32 mmol Trolox/g) which however considered the fruit without seed. Once again, the AA measured by TEAC assay in jabuticaba was higher than that reported in the literature for berries, such as blackberry (0.11 mmol Trolox/g), strawberry (0.11 mmol Trolox/g), cherry

(0.07 mmol Trolox/g), red raspberry (0.06 mmol Trolox/g) and blueberry (0.05 mmol Trolox/g) (de Souza *et al.*, 2014).

A strong positive correlation ( $r>0.97$ ,  $p<0.001$ ) among the different AA assays was observed, suggesting that they are equally successful for measuring the AA. Moreover, we also found a strong positive correlation between AA values, independently of the assay, and the contents of total phenolic of jabuticaba ( $r>0.97$ ,  $p<0.001$ ), indicating that these bioactive compounds contribute to AA of these samples.

#### **4. Conclusion**

Our results demonstrated that jabuticaba whole fruit and its fractions (peel, seed and residue) can be considered a source of dietary fiber and have high antioxidant activity and phenolic compounds contents compared to other berries. Although the pulp showed the lowest values of antioxidant activity and phenolic compounds, this fraction presented high contents of manganese, copper and iron. Cyanidin-3-*O*-glucoside was the major phenolic compound in jabuticaba peel and residue, while in jabuticaba seed and pulp myricetin was predominant. Jabuticaba whole fruit and seeds exhibited approximately 45% and 51%, respectively, of total phenolic compounds on conjugated forms highlighting the importance of using the free and conjugate phenolic compounds extraction method to better characterize the polyphenol profile of fruits. Tocopherols and carotenoids were identified for the first time in jabuticaba and the observed contents suggest that this fruit is not rich in tocopherols, but could be considered a moderate source of  $\beta$ -carotene. Together, our results indicate that jabuticaba has great commercial potential due to its nutritional and bioactive compounds, which has contribute to the economic valorization of this fruit and its fractions.

#### **5. Acknowledgments**

The financial support of Brazilian funding agencies (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) is greatly acknowledged.

## Capítulo 2

**Effect of high hydrostatic pressure processing  
on bioactive compounds of jabuticaba juice**

## 1. INTRODUCTION

Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) is a dark colored fruit native to the Brazilian Atlantic rainforest, which presents high antioxidant activity and is rich in phenolic compounds (Wu *et al.*, 2013). Furthermore, studies have demonstrated the beneficial effects of jabuticaba in health indicating that the fruit has great potential to be considered a functional food (Reynertson *et al.*, 2006; Leite-legatti *et al.*, 2012).

With desirable sensory attributes, jabuticaba fruit presents great commercial potential, as it may be used for producing juices, jams, jellies, vinegars, liqueurs and wines, as well as being consumed fresh (Citadin *et al.*, 2010). However, although jabuticaba is popular throughout Brazil, it does not have high economic value because of its high perishability, which hampers its commercialization (Agostini *et al.*, 2009). In the last years, the Brazilian fruit juice industry has undergone an expansion especially due to the conquering of external markets with tropical fruit juices that exhibit high nutritional value as well as exotic flavors (Menezes *et al.*, 2008). Therefore, the production of jabuticaba juice may be an interesting alternative to the valorization of this fruit.

Thermal blanching remains the most widely adopted technology for preservation of fruit juices, however this process usually results in loss of natural flavors and nutritional value (Tadapaneni *et al.*, 2014). Therefore, in order to expand the consumer market for jabuticaba juice, the use of emerging conservation technologies, such as high hydrostatic pressure (HHP) is being studied. HHP is more energy efficient than traditional conservation techniques, but also allows microbial and enzyme inactivation in order to enhance safety and shelf life of perishable foods, while reducing the negative impact of thermal processing on nutritional and sensory parameters (Menezes *et al.*, 2008; Barba *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013).

The present paper aims to investigate the effect of HHP processing parameters on microbiological activity, phenolic compounds contents, antioxidant activity and consumer acceptance of jabuticaba juice.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Standards and chemicals

Folin-Ciocalteau reagent, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ), 2,2'-azino-bis (2-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), potassium persulfate, ( $\pm$ )-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), fluorescein, potassium phosphate, naringenin, rutin, myricetin, myricitrin, quercetin, kaempferol, and gallic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, vanillic, syringic, 2,4-dihydroxybenzoic, 3,4-dihydroxybenzoic, *p*-dihydroxybenzoic, 2-hydroxycinnamic, *trans*-cinnamic, hippuric, caffeic, ferulic, sinapic, *m*-coumaric, *p*-coumaric, 5-caffeoquinic, rosmarinic, benzoic, salicylic and 4-hydroxyphenylacetic acids were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Cyanidin-3,5-di-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-galactoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, cyanidin-3-*O*-rutinoside, cyanidin, malvidin, delphinidin and pelargonidin were purchased from Indofine Chemical Co. (Hillsborough, NJ, USA). Sodium carbonate was purchased from Spectrum Chemical Manufacturing Corp. (Gardena, CA, USA). Iron (II) sulfate was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All solvents were HPLC grade from Tedia (Fairfield, OH, USA). HPLC grade water (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout the experiments.

### 2.2 Samples

Samples of jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*, cv. Sabará) from Minas Gerais state, Brazil, were purchased during harvest period (October of 2012) at Rio de Janeiro's agricultural trading center. Fruits were selected, washed and sanitized in sodium hypochlorite 100 ppm solution during 15 min. Jabuticaba pulp was produced in a horizontal depulper, subsequently packed in aseptic polyethylene bags and stored at -20 °C.

The Brazilian existing law standards (Brasil, 1997) determine integral juice as a fruit juice without water and sugar addition. Thus, jabuticaba pulp was considered as integral juice of this fruit.

### 2.3 High Hydrostatic Pressure (HHP)

50 mL of frozen jabuticaba juice was thawed, placed in small 5 layers nylon/poly bags with oxygen barrier and vacuum-sealed (TecMaq®, Brazil). These bags were submitted to HHP treatment in a pilot equipment (Bras Solution Ltd., Rio de Janeiro, Brazil), using distilled water and concentrated carboxylate-based synthetic fluid at a ratio of 2:1 (*v/v*) as pressure transmitting medium. Pressure and time of treatment were defined according to a 2<sup>2</sup> full factorial design with a central point, in duplicate, totaling 10 experimental runs (**Table 1**). Microbiological quality, antioxidant activity (AA) measured by FRAP, TEAC and ORAC assays and phenolic compounds by HPLC-DAD were the response variables.

**Table 1.** Process parameters of the 2<sup>2</sup> full factorial design

Process parameter	Levels		
	-1	0	+1
Pressure (MPa)	200	350	500
Time (minutes)	5	7.5	10

The HHP treatment which showed the highest AA and phenolic compounds contents, together with adequate microbiological quality was selected for sensorial analysis.

### 2.4 Antioxidant activity

The antioxidant capacity of the juices was determined by FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) assays.

The FRAP assay was performed according to Benzie & Strain (1996) with slight modifications. FRAP reagent was prepared by mixing 2 mL of 10 mM TPTZ solution in 6N HCl, 2 mL of 20 mM FeCl<sub>3</sub> solution and 20 mL of 300 mM acetate buffer (pH 3.6) which was warmed to 37 °C prior to analysis. Twenty µL of extract were pipetted into a 96-well microplate, which was placed in the Vitor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter with automatic injector. 180 µL of FRAP reagent were automatically dispensed into each well, the plate was shaken and allowed to stand at 37 °C for 6 min. The absorbance was read at 595 nm and quantification was performed using a calibration curve prepared with FeSO<sub>4</sub>. Results were expressed as µmol of Fe<sup>+2</sup> equivalents per 100 mL of juice. Each sample was analyzed in triplicate.

The TEAC assay was performed according to Re, Pellegrini & Proteggente (1999) with slight modifications. The ABTS radical cation stock solution was generated by reacting K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> and ABTS for 12 to 16 h prior to use. ABTS radical cation stock solution was diluted (1:50) to an absorbance of 0.70±0.02 at 720 nm. Ten µL of extract were pipetted into a 96-well microplate, which was placed in the Vitor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter with automatic injector. ABTS radical cation solution (190 µL) were automatically dispensed into each well, the plate was shaken and allowed to stand at 37 °C for 6 min. Sample absorbance was read at 720 nm and subtracted from solvent blank. Quantification was performed using a calibration curve prepared with Trolox. Results were expressed as µmol of Trolox equivalents per 100mL of juice. Each sample was analyzed in triplicate.

The ORAC assay was performed according to Zulueta *et al.* (2009) with slight modifications. 100 µL of extract and 100 µL of fluorescein solution (7.8 µM) were pipetted into a 96-well microplate, which was placed in the Vitor<sup>3</sup> 1420 multilabel counter with automatic injector. Fifty µL of AAPH solution (221 mM) were automatically dispensed into each well, the plate was shaken and fluorescence was read at 485 nm excitation and at 535 nm emission using cycles of 30 seconds between readings until fluorescence loss. Quantification was performed using the difference between the areas under the curve of sample and blank. A calibration curve was prepared using Trolox and results were expressed as µmol of Trolox equivalents per 100mL of juice. Each sample was analyzed in triplicate.

## **2.5 Phenolic compounds content by HPLC-DAD**

Jabuticaba juice was analyzed directly after centrifugation (11300 g, 10 min). All samples were stored at -20 °C until analysis and were filtered with a 0.45 µm cellulose ester membrane (Millipore®, Brazil) prior to HPLC analysis. For anthocyanin analysis the samples were diluted (1:1) with 1% aqueous formic acid.

The liquid chromatography system (Shimadzu®, Japan) included a quaternary pump LC-20AT, automatic injector SIL-20AHT, diode array detector (DAD) SPD-M20A, system controller CBM-20A and degasser DGU-20A5.

Chromatographic separation of anthocyanins was achieved using a reverse phase column C18 (5 µm, 250 mm × 4.6 mm, Kromasil®). The mobile phase consisted of a gradient of 1% aqueous formic acid (eluent A), 1% formic acid in methanol (eluent B) and acetonitrile (eluent C), with a flow rate of 2.0 mL/min. Eluent C concentration was kept constant at 2% during analysis. Prior to injection, the column was equilibrated with 18% B. After injection of

sample, this proportion was kept constant until 2 min, increased to 32% B in 6 min and to 52% B in 8 min, and then decreased to 18% B in 18 min. Between injections, 10 min intervals were used to re-equilibrate the column with 18% B. Anthocyanins were monitored by DAD at 530 nm.

Chromatographic separation of non-anthocyanin phenolic compounds was achieved using a reverse phase column C18 (5 µm, 250 mm × 4.6 mm, Phenomenex®). The mobile phase consisted of a gradient of 0.3% aqueous formic acid (eluent A), methanol (eluent B) and acetonitrile (eluent C), with a flow rate of 1.0 mL/min. Eluent C concentration was kept constant at 1% during analysis. Prior to injection, the column was equilibrated with 18% B. After injection of sample, this proportion was increased to 20% B in 1 min, 43% B in 18 min, 85% in 23 min and kept constant until 30 min. Between injections, 10 min intervals were used to re-equilibrate the column with 18% B. Non-anthocyanins phenolic compounds were monitored by DAD from 190 to 370 nm.

Identification of analytes was performed by comparison with retention time and absorption spectrum of the respective standard. Quantification was performed by external calibration. Data were acquired by LC solution software (Shimadzu Corporation®, version 1.25, 2009).

## 2.6 Microbiological Analyses

Samples were homogenized in sterile peptone water 0.1% and serially diluted ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  for control sample and  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-7}$  for HHP processed samples). Man, Rogosa and Sharp (MRS), plate count agar (PCA), potato dextrose agar (PDA) and Chromocult® culture medias were prepared for detection of lactic bacteria, heterotrophic bacteria, yeasts and molds, coliforms at 35°C and *Salmonella sp*, respectively. For each culture media plate 100 mL of diluted juices was inoculated. The spreading of the sample was conducted with the handle and Drigalski plates incubated for 48 h at 37 ° C. Analyses were performed in duplicate.

## 2.7 Acceptance sensory analysis

Sensory acceptance of jabuticaba juice, pressurized at 350 MPa for 7.5 min, was carried out with a group of 80 untrained consumers (49 females and 31 males) aged between 17 and 79 years, with habitual consumption fruit juices at least once a week (**Annex 1**). The

subjects were recruited among staff, students and visitors of Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil. It was evaluated the following acceptance attributes: overall impression, aroma, taste, appearance and texture using an unstructured (9 cm) scale of attributes, with intensity ranging from 0 (“dislike extremely”) to 9 (“like extremely”) and the attribute “indifferent” specified in 4.5 cm (**Annex 2**). Samples (25 mL) of jabuticaba juice were presented at 10 °C in 50 mL plastic cups coded with three-digit numbers. The purchase intent assessment was performed by a five point structured scale, anchored at opposite ends with the expressions “I definitely would not buy” and “I definitely would buy” (Meilgaard *et al.*, 2006). The samples were presented in a monadic sequential balanced order (MacFie *et al.*, 1989) and each consumer evaluated both control and pressurized juices.

## 2.8 Statistical analysis

The experimental design matrix was generated and analyzed using Statistica software, version 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). The acceptance and purchase intent of control and HHP treated juices was compared using paired t-test and Wilcoxon matched pairs signed rank test, respectively. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software for Windows, version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

As previously described in chapter 1, jabuticaba pulp showed high moisture contents (90.7%) and low pH values (3.3) that can inhibit the growth of most pathogenic microorganisms. This fraction was the main contributor to the fruit total soluble solids (11.8° Brix) and exhibited high contents of carbohydrates (86.9% to 93.1%). Despite dietary fiber was not detected at jabuticaba pulp, this fraction is known to present high contents of total sugars (Lima *et al.*, 2011), responsible for the fruit sweet taste and great potential for juice production. In relation to energetic values, according to Brazilian’s population food guide (Brasil, 2005), 200 mL of fresh jabuticaba pulp corresponds to one fruit serving of 70 kcal, which represents only 3.5% of the energy daily intake based on a 2000 kcal diet, and is lower than those reported for usually consumed fruit juices like cashew apple (100 kcal), apple (100 kcal), grape (120 kcal) and orange (130 kcal) (Franco, 2005). Although the pulp showed the lowest values of antioxidant activity and phenolic compounds, this fraction may be considered

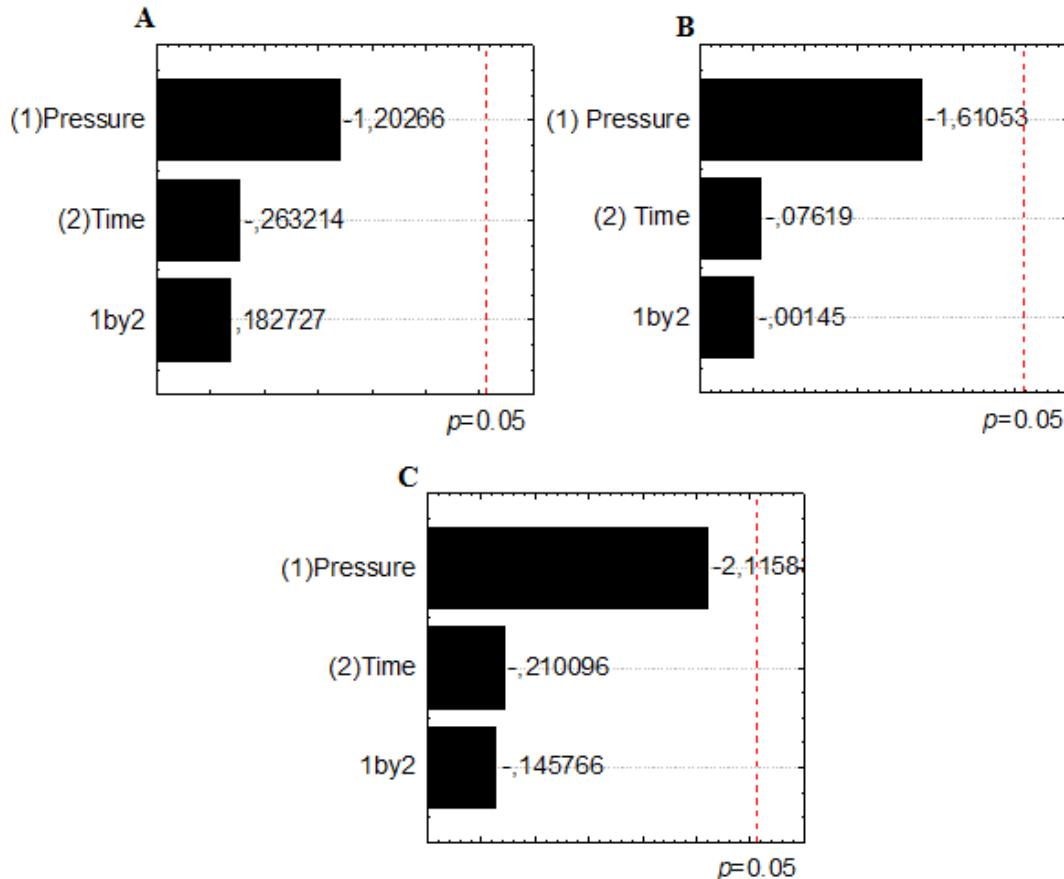
a nutritional source of the essential micronutrients manganese, copper and iron. Besides, potassium was the most abundant mineral in jabuticaba pulp and although its micronutrient contribution to RDA may be considered low (7.2% for 200 mL of pulp), other fruits recognized to be sources of potassium such as guava and orange show similar contributions to RDA (8.4% and 7.0% of RDA for 200g of fruit, respectively) (TACO, 2011).

### 3.1 Experimental design

The factorial design matrix and the obtained results for the response variables are shown in **Table 2**.

#### 3.1.1 Antioxidant activity

The AA of jabuticaba juices measured by FRAP (**Figure 1A**), ORAC (**Figure 1B**) and TEAC (**Figure 1C**) assays was not affected by either pressure or time.



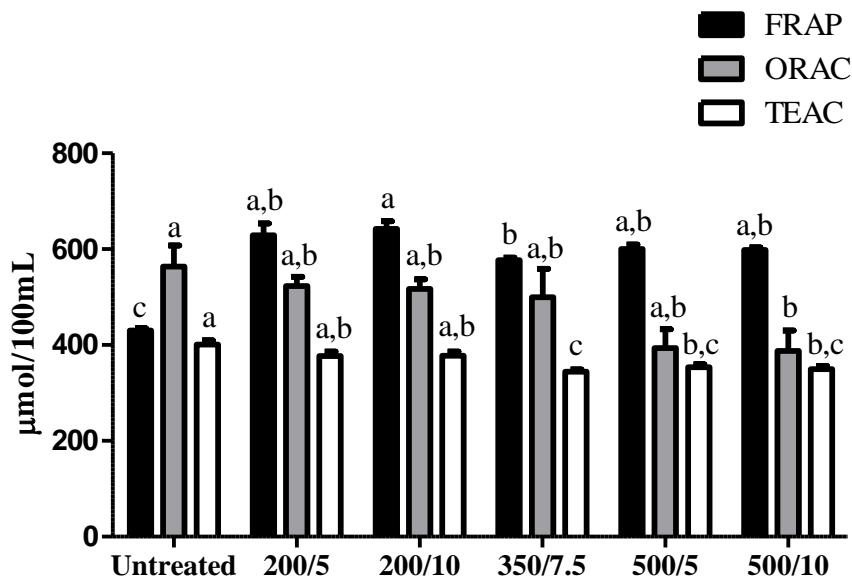
**Figure 1.** Pareto chart of standardized effects of pressure and time on jabuticaba juice antioxidant activity measured by FRAP (A), ORAC (B) and TEAC (C) assays.

**Table 2.** Factorial design matrix for optimization of HHP conditions.

Run/Replicate		Pressure (MPa)	Time (min)	FRAP <sup>1</sup>	TEAC <sup>2</sup>	ORAC <sup>3</sup>	Cyanidin-3-O-glucoside <sup>4</sup>	Rutin <sup>4</sup>	Gallic acid <sup>4</sup>	Myricetin <sup>4</sup>	Total phenolics <sup>5</sup>
1	1	200	5	573.5±11.7	357.8±5.9	496.2±7.8	108.3±0.0	320.4±76.2	97.9±21.1	198.0±38.7	724.4±16.7
2	1	500	5	583.3±15.1	362.4±16.3	469.3±52.6	73.2±0.0	426.8±42.1	75.8±13.8	181.8±13.5	757.5±69.5
3	1	200	10	608.3±14.2	362.0±10.0	473.2±3.6	86.6±0.0	412.7±6.1	101.0±16.6	202.4±39.5	802.6±50.1
4	1	500	10	603.7±13.8	352.4±16.1	291.5±1.4	75.6±0.0	390.8±119.1	77.4±10.1	191.1±2.7	734.9±131.9
5 (C)	1	350	7.5	575.1±18.6	350.2±12.5	620.6±73.9	67.4±0.0	324.9±87.5	68.4±5.9	157.5±6.2	618.3±99.6
6	2	200	5	684.1±5.8	396.4±14.3	549.6±58.4	107.9±0.0	378.1±44.4	77.9±8.6	160.1±7.4	723.9±43.2
7	2	500	5	617.7±13.2	345.5±8.3	318.3±58.6	72.2±0.0	330.0±56.7	78.5±11.5	151.2±22.6	631.9±90.8
8	2	200	10	676.1±18.7	393.7±15.8	560.6±20.6	84.4±0.0	374.0±150.6	82.7±12.2	185.0±20.8	726.1±183.7
9	2	500	10	592.5±15.4	346.8±20.1	483.7±5.1	73.4±0.0	369.9±105.7	76.7±14.5	133.2±35.5	653.1±155.7
10 (C)	2	350	7.5	578.9±4.4	337.9±11.5	378.9±58.4	69.0±0.0	344.3±83.3	70.3±4.1	158.9±22.8	642.4±110.2

<sup>1</sup>FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{mL}$ ). <sup>2</sup>TEAC ( $\mu\text{mol trolox}/100\text{mL}$ ). <sup>3</sup>ORAC( $\mu\text{mol trolox}/100\text{mL}$ ). <sup>4</sup>Results are expressed as  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ . <sup>5</sup>Total phenolic contents by HPLC-DAD analysis ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ). <sup>6</sup>C- center point.

When compared to untreated (control) juice, we observed that pressurization led to an increase up to 45% in AA measured by FRAP assay. Pressurization up to 500 MPa for 5 min did not affect AA assessed by ORAC assay, but at the most drastic condition (500 MPa for 10 min) a 31% decrease was observed. At pressures higher than 200 MPa, AA measured by TEAC assay showed a decrease of up to 14% (**Figure 2**). The differences between the AA results may be justified by the different assays mechanisms. Assays based in hydrogen atom transfer (HAT) and single electron transfer (SET) mechanisms provide conceptually different information, where HAT is a kinetic measurement, while SET is a thermodynamic measurement, based on the redox potential of the reagents (Prior *et al.*, 2005). Therefore, while HAT-based assays (e.g., ORAC and TEAC) allow to estimate the trapping capacity of most reactive compounds, SET-based assays (e.g., FRAP) provide an overall picture of the effective efficiency of oxidation/reduction of all antioxidants present in the sample, including the “slow” ones, which are not detected by kinetic methods. However, how HHP process affects these mechanisms was not yet elucidated.



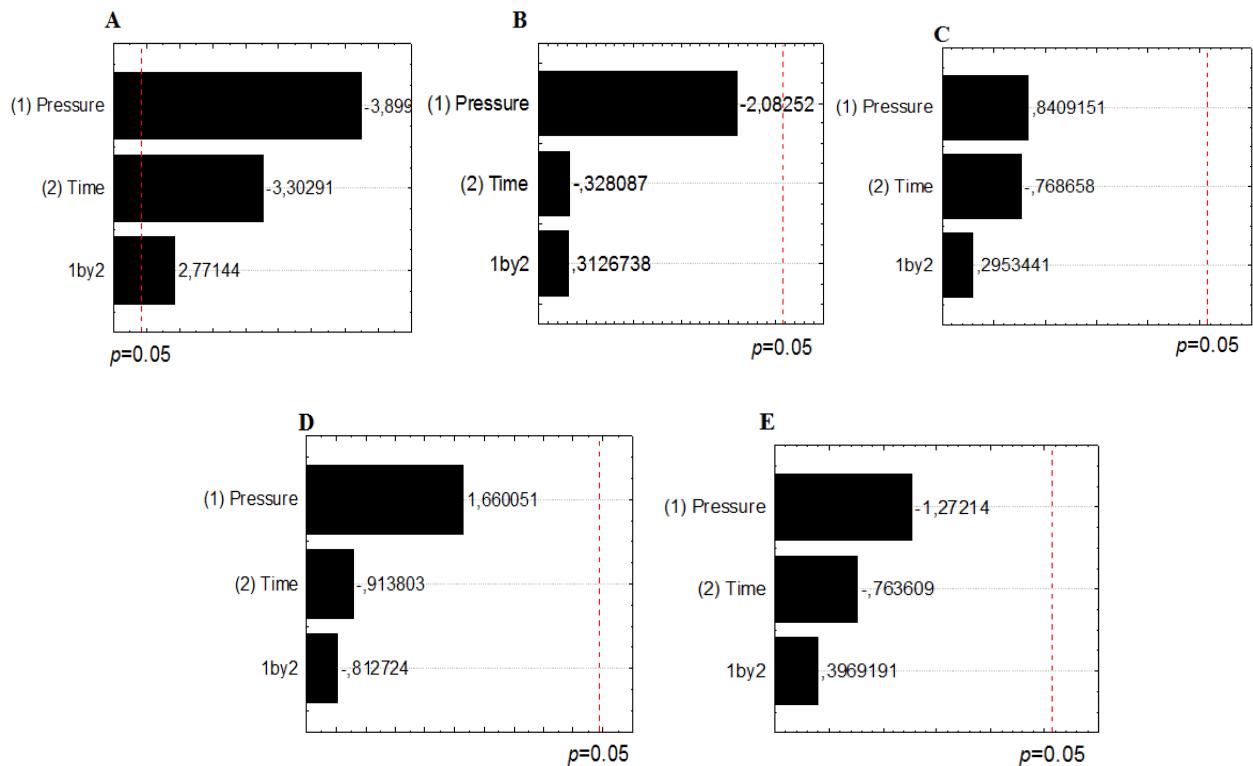
**Figure 2.** Antioxidant activity measured by FRAP, ORAC and TEAC assays of untreated (control) and HHP treated jabuticaba juices. Different letters within the same AA assay indicate significant differences between samples ( $p<0.05$ ).

Similarly to our results, Vega-Gálvez *et al.* (2014) observed an increase in AA of gooseberry pulp measured by FRAP after pressurization at 300, 400 and 500 MPa for 1, 3 and 5 minutes, while Barba *et al.* (2013) reported that pressurization of blueberry juices at 200 MPa for up to 15 min did not affect TEAC values in comparison to control juice. Moreover,

these authors observed decreasing TEAC values for blueberry juices treated at 400 MPa for 15 min and 600 MPa independently of pressurization time. The increase of AA could be attributed to a better extractability of antioxidant components (Barba *et al.*, 2013; Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2014), whereas, its decrease could be related to activation of enzymes, such as polyphenol oxidase and peroxidase during pressurization, as observed by Huang *et al.* (2013) after apricot nectar pressurization at 300, 400 and 500 MPa for 5, 10, 15 and 20 min.

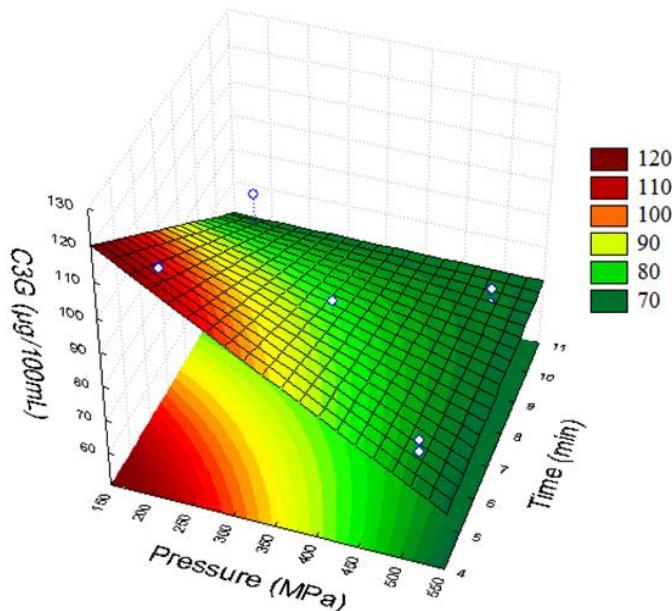
### 3.1.2 Phenolic compounds contents by HPLC-DAD

Cyanidin-3-*O*-glucoside, gallic acid, rutin and myricetin were quantified in jabuticaba juices. Cyanidin-3-*O*-glucoside was the only phenolic compound affected by pressure and treatment time as well as the interaction of these parameters (**Figure 3**).



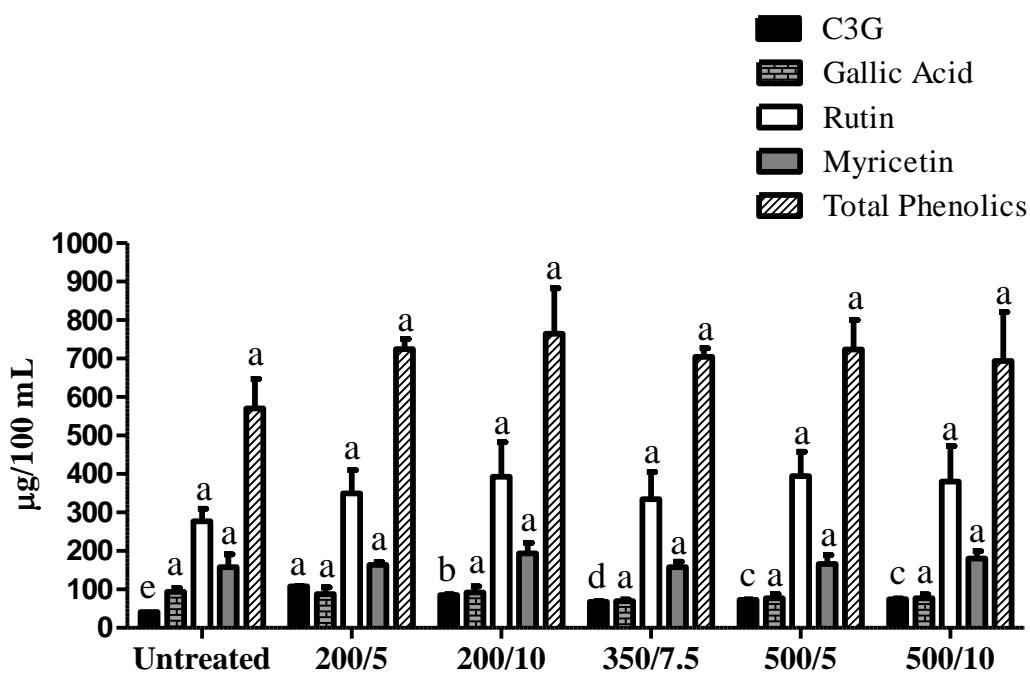
**Figure 3.** Pareto chart of standardized effects of pressure and time on jabuticaba juice phenolic compounds analyzed by HPLC-DAD: cyanidin-3-*O*-glucoside (A), gallic acid (B), rutin (C), myricetin (D), total phenolic contents (E).

**Figure 4** shows that the highest C3G contents were found at lower pressures and shorter treatment times.



**Figure 4.** Surface response chart for cyanidin-3-O-glucoside contents ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ) measured by HPLC.

When compared to untreated (control) juice, we observed that pressurization led to an increase up to 160% on C3G contents. On the other hand gallic acid, rutin, myricetin and the sum of total phenolic compounds contents were not affected by pressurization (Figure 5). Similarly to our results, Ferrari *et al.* (2010) reported that anthocyanins contents in pomegranate juice pressurized at room temperature were higher at lower pressures and treatment times when compared to the control juice. Furthermore, Cao *et al.* (2011) evaluated the effect of HHP on phenolic compounds of strawberry pulp and observed an increase of approximately 8% on C3G contents at 500 MPa for 15 and 20 minutes when compared to the control pulp. According to Vásquez-Gutiérrez *et al.* (2014), the application of HHP produce microstructural changes in vegetable tissues improving the extractability of some compounds, thus explaining our results. Cao *et al.* (2011) and Vega-Gálvez *et al.* (2014) also reported, respectively, a preservation of myricetin on strawberry pulps pressurized at 400, 500 and 600 MPa for 5 to 25 min and a maintenance of total phenolic compounds contents after gooseberry pulp pressurization at 300, 400 and 500 MPa for 1, 3 and 5 min.



**Figure 5.** Phenolic compounds contents by HPLC-DAD of untreated (control) and HHP treated jabuticaba juices. Different letters within the same compound indicate significant differences between samples ( $p<0.05$ ).

### 3.2 Microbiological Analyses

Microbiological analyses results showed absence of coliforms at 35°C and *Salmonella* sp at control and all HHP treated juices (Table 3), demonstrating that the juices presented satisfactory sanitary conditions in accordance to Brazilian existing legal standards (Brasil, 2001) and that good manufacturing practices were followed during jabuticaba juice production. The low pH value of jabuticaba juice (3.3) also contributes to the lower risk of microbial contamination as it inhibits the growth of most pathogenic microorganisms (Lavinas *et al.*, 2006). In control juice, although no pathogenic bacteria was found, we observed the presence of heterotrophic bacteria, yeasts, molds and lactic bacteria, non-pathogenic microorganisms that are usually acid tolerant and related to sensory quality loss during storage of juices (Lavinas *et al.*, 2006; Varela-Santos *et al.*, 2012). HHP treatments progressively decreased the contamination of jabuticaba juices yielding juices with none of the evaluated microorganisms at 350 MPa for 7.5 min or in more drastic conditions. Similar results were reported by Varela-Santos *et al.* (2012) which observed inactivation of total

aerobic mesophilic bacteria, molds and yeasts at 350 MPa for 150 seconds and at 450 MPa and 550 MPa for 30, 90 and 150 seconds, and by Lavinas *et al.* (2007) which reported aerobic mesophilic bacteria inactivation after pressurization of cashew apple juice at 350 MPa for 7 min and at 400 MPa for 3 and 7 min. These results highlight the potential of HHP in enhancing shelf life of perishable foods.

Considering the AA and phenolic compounds contents together with optimum microbiological quality, HHP treatment at 350 MPa for 7.5 min was selected for sensorial analysis.

**Table 3.** Microbiological analyses of untreated (control) and HHP treated jabuticaba juices.

	Coliforms 35°C (MPN/50 mL) <sup>1</sup>	Salmonella sp (25 mL)	Heterotrophic Bacteria (CFU/mL) <sup>2</sup>	Yeasts and Molds (CFU/mL) <sup>2</sup>	Lactic Bacteria (CFU/mL) <sup>2</sup>
<b>Control</b>	Absent	Absent	200	8300	1200
<b>200 MPa/5 min</b>	Absent	Absent	180	6200	1000
<b>200 MPa/10 min</b>	Absent	Absent	110	1800	110
<b>350 MPa/7.5 min</b>	Absent	Absent	0	0	0
<b>500 MPa/5 min</b>	Absent	Absent	0	0	0
<b>500 MPa/10 min</b>	Absent	Absent	0	0	0

<sup>1</sup>MPN= most probable number. <sup>2</sup>CFU= colony forming units.

### 3.3 Acceptance sensory analysis

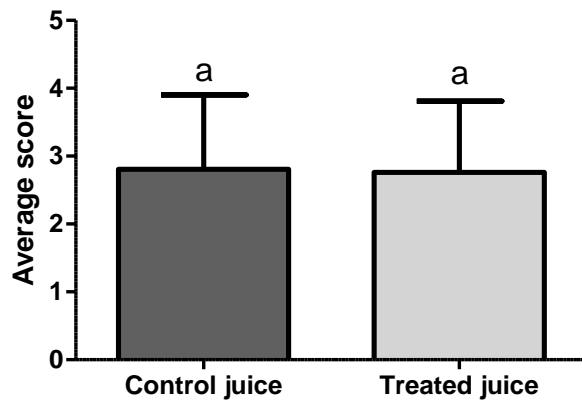
No significant difference was observed between the consumers' scores for both juices regarding overall impression, appearance and texture attributes (**Table 4**) and also with respect to purchase intent (**Figure 6**). These results indicate that, in general, both juices were equally accepted, with a mean score equivalent to "indifferent" for overall impression attribute and "I might buy it/I might not buy it" for purchase intent. However, untreated (control) jabuticaba juice showed higher acceptance scores for aroma and taste attributes than HPP treated juice (**Table 4**). HPP process may affect the rate of enzymatic and chemical reactions as well as flavor molecules, thus resulting in slightly modified sensory attributes

(Oey *et al.*, 2008; Rendueles *et al.*, 2011). Nevertheless, HHP treatment of fruit smoothies at 450 MPa for 1, 3 and 5 min retained more fresh-like characteristics than traditional thermal processing (Keenan *et al.*, 2011). Therefore, thermal treatment of jabuticaba juice would probably lead to a more prominent loss of sensory quality than that observed for HHP in the present work.

**Table 4.** Acceptance scores reported by consumers ( $n=80$ ) for untreated (control) and HHP treated jabuticaba juice at 350 MPa for 7.5 min<sup>1</sup>

<b>Attributes</b>					
	Overall impression	Aroma	Taste	Appearance	Texture
<b>Control juice</b>	$4.5 \pm 2.1^a$	$4.9 \pm 1.8^a$	$5.2 \pm 2.6^a$	$3.2 \pm 2.1^a$	$4.1 \pm 2.4^a$
<b>Treated Juice</b>	$4.4 \pm 1.9^a$	$4.5 \pm 1.9^b$	$4.7 \pm 2.3^b$	$3.5 \pm 2.1^a$	$4.4 \pm 2.4^a$

<sup>1</sup>Different letters in the column indicate significantly difference between juices acceptance scores (paired *t*-test,  $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Purchase intent scores reported by consumers ( $n=80$ ) for untreated (control) and HHP treated jabuticaba juice at 350 MPa for 7.5 min. The same letters indicate no significant difference between juices purchase intent scores (Wilcoxon matched pairs signed rank test,  $p < 0.05$ ).

#### **4. Conclusions**

In conclusion, moderate pressurization conditions (350 MPa for 7.5 min) were adequate to ensure jabuticaba juice microbiological quality while maintaining bioactive compounds contents and antioxidant activity. In general, both control and HHP jabuticaba juices were equally accepted with no differences in overall impression, appearance and texture, as well as purchase intent scores. The stability study of pressurized juice regarding microbiological quality, phenolic compounds contents and antioxidant activity is being conducted and will allow suggesting the best condition for jabuticaba juice storage.

#### **5. Acknowledgments**

The authors would like to thank Prof Vera Lúcia Valente Mesquita (Nutrition Institute of Federal University of Rio de Janeiro) for allowing the use of the high hydrostatic pressure equipment. The financial support of Brazilian funding agencies (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) is greatly acknowledged.

## Referências Bibliográficas

- Abe, L. T., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2011). Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1679–1687.
- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55.
- Agostini, J. da S., Cândido, A. C. da S., Teodósio, T. K. C., Rodrigues, J. N., Garcete, G. J., & Scalon, S. de P. Q. (2009). Atmosfera modificada e condições de armazenamento nas características físico-químicas de jabuticabas da cultivar “ paulista .” *Ciência Rural*, 39(9), 2601–2608.
- Alezandro, M. R., Dubé, P., Desjardins, Y., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2013). Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. *Food Research International*, 54(1), 468–477.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods – A brief review. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 66(1), 1–9.
- AOAC International. (2000). *Official methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburg: AOAC International.
- Ascheri, D. P. R., Acheri, J. L. R., & de Carvalho, C. W. P. (2006). Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 26(4), 897–905.
- Bakowska, A., Kucharska, A. Z., & Oszmian, J. (2003). The effects of heating , UV irradiation , and storage on stability of the anthocyanin – polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81, 349–355.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*, 50(2), 545–549.
- Batista, Â. G., Lenquiste, S. A., Cazarin, C. B. B., da Silva, J. K., Luiz-Ferreira, A., Bogusz Jr, S., ... Maróstica Jr, M. R. (2014). Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. *Journal of Functional Foods*, 6, 450–461.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.

- Bobbio, F. O., Druzian, J. I., Abrão, P. A., Bobbio, P. A., & Fadelli, S. (2000). Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 20(3), 388–390.
- Brackett, R.E., & Splittstoesser, D. F. (1992). Fruits and vegetables. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. Compedium for the microbiological examination of foods. 3º edição. Washington DC: American Public Health Association. p. 919-927.
- Brasil. “Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1984, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas”, Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997 (1997). Brasil.
- Brasil. “Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos”, Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998 (1998). Brasil.
- Brasil. “Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”, Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (2001). Brasil.
- Britton, G., & Khachik, F. Carotenoids nutrition and health. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. Volume 5. Carotenoids in food. Boston: Birkhauser Basel. p. 45-66.
- Buzrul, S. (2012). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 1–12.
- Cao, X., Zhang, Y., Zhang, F., Wang, Y., Yi, J., & Liao, X. (2011). Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 877–85.
- Carvalho, E., Fraser, P. D., & Martens, S. (2013). Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chemistry*, 139(1-4), 744–752.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. D. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
- Castro, R. W. (2012). *Caracterização de açaí obtido de frutos de Euterpe edulis martius tratados termicamente*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Chawla, R., Patil, G. R., & Singh, A. K. (2011). High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 260–8.
- Chen, D., Xi, H., Guo, X., Qin, Z., Pang, X., Hu, X., ... Wu, J. (2013). Comparative study of quality of cloudy pomegranate juice treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 85–94.
- Citadin, I., Danner, M. A., & Sasso, S. A. Z. (2010). Jabuticabeiras. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(2), 343–656.

- Colombo, A. F., & Joly, C. (2010). Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology*, 70(3), 697–708.
- Da Silva, L. M. R., de Figueiredo, E. A. T., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., de Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398–404.
- Darnet, S., Serra, J. L., Rodrigues, A. M. da C., & da Silva, L. H. M. (2011). A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*). *Food Research International*, 44(7), 2107–2111.
- De Castro, V. C., da Silva, P. H. A., de Oliveira, E. B., Desobry, S., & Humeau, C. (2014). Extraction, identification and enzymatic synthesis of acylated derivatives of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) fruits. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(1), 196–204.
- De Jesus, N., Martins, A. B. G., de Almeida, E. J., Leite, J. B. V., Ganga, M. R. D., Junior, E. J. S., ... Moreira, R. F. C. (2004). Caracterização de quatro grupos de jabuticabeira, nas condições de jaboticabal-SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(3), 482–485.
- De Jesus, T. B., Fernandez, L. G., & Queiroz, A. F. D. S. (2008). Avaliação da concentração de cádmio, cobre, ferro, manganês, níquel e zinco em anomalocardia brasiliiana (gmelin, 1791) provenientes de zonas de manguezal da região de são francisco do conde e madre de deus, recôncavo baiano, BA. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, 3(1), 77-84.
- De Rosso, V. V., Hillebrand, S., Montilla, E. C., Bobbio, F. O., Winterhalter, P., & Mercadante, A. Z. (2008). Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 291–299.
- De Souza, V. R., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., Lima, L. C. de O., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362–8.
- Dessimoni-Pinto, N. A. V., Moreira, W. A., Cardoso, L. de M., & Pantoja, L. A. (2011). Jaboticaba peel for jelly preparation: an alternative technology. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 2010(004362), 864–869.
- Díaz-García, M. C., Obón, J. M., Castellar, M. R., Collado, J., & Alacid, M. (2013). Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chemistry*, 138(2-3), 938–49.
- Dinelli, G., Segura-Carretero, A., Di Silvestro, R., Marotti, I., Arráez-Román, D., Benedettelli, S., ... Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Profiles of phenolic compounds in modern and old common wheat varieties determined by liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1218(42), 7670–81.

Dragano, N. R. V., Marques, A. Y. C., Cintra, D. E. C., Solon, C., Morari, J., Leite-Legatti, A. V., ... Maróstica-Júnior, M. R. (2013). Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. *The British Journal of Nutrition*, 110(3), 447–55.

FAO/WHO. (1999). Fifty-third meeting of joint FAO/WHO expert committee on food additives. Roma.

Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry* (3rd ed., p. 1067). New York: CRC Press.

Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 245–253.

Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2011). The Effects of High Hydrostatic Pressure on the Polyphenols and Anthocyanins in Red Fruit Products. *Procedia Food Science*, 1(Icef 11), 847–853.

Franco, G. (2005). *Tabela de Composição Química de Alimentos* (9th ed., p. 307). São Paulo: Atheneu.

Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., de la Torre, M. C., & López-Sabater, M. (2000). Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 251–254.

Gordon, A., Cruz, A. P. G., Cabral, L. M. C., de Freitas, S. C., Taxi, C. M. A. D., Donangelo, C. M., ... Marx, F. (2012). Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. *Food Chemistry*, 133(2), 256–263.

Gurak, P. D., De Bona, G. S., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2014). Jaboticaba Pomace Powder Obtained as a Co-product of Juice Extraction: A Comparative Study of Powder Obtained from Peel and Whole Fruit. *Food Research International*, 62, 786–792.

Hartyáni, P., Dalmadi, I., Cserhalmi, Z., Kántor, D.-B., Tóth-Markus, M., & Sass-Kiss, Á. (2011). Physical-chemical and sensory properties of pulsed electric field and high hydrostatic pressure treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), 255–260.

He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163–187.

Hellmann, M. E., Mello, J. I. de O., Barbedo, C. J., & Figueiredo-Ribeiro, R. de C. L. (2008). Variações dos carboidratos de reserva de sementes de Caesalpinia echinata (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas. *Hoehnea*, 35(2), 255–264.

Henríquez, C., López-Alarcón, C., Gómez, M., Lutz, M., & Speisky, H. (2011). Time-dependence of ferric reducing antioxidant power (FRAP) index in Chilean apples and berries. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 323–332.

- Herrera-Hernández, M. G., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R., & Guzmán-Maldonado, S. H. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129(4), 1744-1750.
- Hogan, E., Kelly, A. L., & Sun, D.-W. (2005). High Pressure Processing of Foods : An Overview. *Emerging Technologies for Food Processing*, 3–32.
- Hu, M. L. (2011). Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Medical Journal*, 449-460.
- Huang, H.-W., Lung, H.-M., Yang, B. B., & Wang, C.-Y. (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40(31), 250–259.
- Huang, W., Zhang, H., Liu, W., & Li, C. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(2), 94–102.
- Huang, W., Bi, X., Zhang, X., Liao, X., Hu, X., & Wu, J. (2013). Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 74-82.
- Hugas, M., Garriga, M., & Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62(3), 359–371.
- Huppertz, T., Kelly, A. L., & Fox, P. F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, 12(7), 561–572.
- IOM. (2005). *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. Washington DC: The National Academies Press.
- Kammerer, D. R., Kammerer, J., Valet, R., & Carle, R. (2014). Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients.
- Kang, J., Thakali, K. M., Xie, C., Kondo, M., Tong, Y., Ou, B., ... Wu, X. (2012). Bioactivities of açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. *Food Chemistry*, 133(3), 671–677.
- Keenan, D. F., Brunton, N., Gormley, R., & Butler, F. (2011). Effects of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(2), 601–607.
- Jordão, R. E., Bernardi, J. L. D., & Filho, A. D. A. (2009). Prevalence of iron-deficiency anemia in Brazil: a systematic review. *Revista Paulista de Pediatria*, 27(1), 90-98.

Laboissière, L. H. E. S., Deliza, R., Barros-Marcellini, A. M., Rosenthal, A., Camargo, L. M. A. Q., & Junqueira, R. G. (2007). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on sensory characteristics of yellow passion fruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4), 469–477.

Lavinas, F. C., de Almeida, N. C., Miguel, M. A. L., Lopes, M. L. M., & Valente-Mesquita, V. L. (2006). Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju in natura armazenado em diferentes condições de estocagem. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 26(4), 875–883.

Lavinas, F. C., Lopes, M. L. M., & Mesquita, V. L. V. (2007). Efeito da alta pressão hidrostática sobre a inativação de microrganismos. *Boletim Do CEPPA*, 25(1), 25–36.

Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Maróstica, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2277–2283.

Leite-Legatti, A. V., Batista, Â. G., Dragano, N. R. V., Marques, A. C., Malta, L. G., Riccio, M. F., ... Maróstica, M. R. (2012). Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Research International*, 49(1), 596–603.

Lenquiste, S. A., Batista, Â. G., Marineli, R. D. S., Dragano, N. R. V., & Maróstica, M. R. (2012). Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Research International*, 49(1), 153–160.

León-González, A. J., Truchado, P., Tomás-Barberán, F. A., López-Lázaro, M., Barradas, M. C. D., & Martín-Cordero, C. (2013). Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in Corema album (L.) D. Don berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 58–63.

Lima, A. D. J. B., Corrêa, A. D., Alves, A. P. C., Abreu, C. M. P., & Dantas-Barros, A. M. (2008). Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 58(4), 416–421.

Lima, A. D. J. B., Corrêa, A. D., Dantas-Barros, A. M., Nelson, D. L., & Amorim, A. C. L. (2011). Sugars, organic acids, minerals and lipids in jabuticaba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(2), 540–550.

Lima, A. D. J. B., Corrêa, A. D., Saczk, A. A., Martins, M. P., & Castilho, R. O. (2011). Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(3), 877–887.

Macfie, H. J., & Bratchell, N. (1999). Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4, 129–148.

Marinova, D., & Ribarova, F. (2007). HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 370–374.

- McKay, D. L., Oliver Chen, C.-Y., Zampariello, C. a., & Blumberg, J. B. (2014). *Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults*. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.062
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., & Civille, G. V. (2006). *Sensory evaluation techniques* (4th ed., p. 448). Boca Raton: CRC Press.
- Menezes, E. M. da S., Torres, A. T., & Srur, A. U. S. (2008). Valor nutricional da polpa de açaí (Euterpe oleracea Mart) liofilizada. *ACTA Amazônica*, 38(2), 311–316.
- Moreno, L. R. (2010). *Caracterização física-química e potencial funcional da polpa, suco e casca de Myrciaria cauliflora Berg (Jabuticaba Sabará)*. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2005). Microbiological aspects of high pressure processing. *Emerging Technologies for Food Processing*, 47–65.
- Oey, I., Lille, M., Loey, A. Van, & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 320–328.
- Pajak, P., Socha, R., Gałkowska, D., Rożnowski, J., & Fortuna, T. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 143, 300–306.
- Patras, A., Brunton, N. P., Pieve, S. D., & Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 308–313.
- Paulo, M. G., Marques, H. M. C., Morais, J. A. G., & Almeida, A. J. (1999). An isocratic LC method for the simultaneous determination of vitamins A, C, E and β-carotene. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21(2), 399–406.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10), 1231–1237.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., & Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1251–1260.
- Reynertson, K. A., Wallace, A. M., Adachi, S., Gil, R. R., Yang, H., Basile, M. J., ... Kennelly, E. J. (2006). Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69(8), 1228–1230.

- Reynertson, K. A., Yang, H., Jiang, B., Basile, M. J., & Kennelly, E. J. (2008). Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109(4), 883–890.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.
- Rodriguez-amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods* (p. 64). Washington DC: ILSI Press.
- Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., de Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121(4), 996–1002.
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Vergara, C., Baer, D. V., Zapata, M., Hitschfeld, A., Obando, L., & Mardones, C. (2013). Anthocyanins profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*, 51(2), 706–713.
- Sancho, R. a. S., & Pastore, G. M. (2012). Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International*, 46(1), 378–386.
- Sarkar, D., & Shetty, K. (2014). Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 395–413.
- Sasso, S. A. Z., Citadin, I., & Danner, M. A. (2010). Propagação de jabuticabeira por estaquia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(2), 577–583.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1), 152–178.
- Suzuki, A. (2002). High pressure-processed foods in Japan and the world. *Trends in High Pressure Bioscience and Biotechnology*, 19, 365–374.
- TACO. (2011). *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos* (4th ed., p. 161). Campinas: UNICAMP-NEPA.
- Tadapaneni, R. K., Daryaei, H., Krishnamurthy, K., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2014). High-Pressure Processing of Berry and Other Fruit Products: Implications for Bioactive Compounds and Food Safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3877–3885.
- Taie, H., El-Mergavi, R., & Radwan, S. (2008). Isoflavonoids, flavonoids, phenolic acids profiles and antioxidant activity of soybean seeds as affected by organic and bioorganic fertilization. *American Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 4(2), 207–213.
- Tan, B., & Brzuszkiewicz, L. (1989). Separation of tocopherol and tocotrienol isomers using normal- and reverse-phase liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 180, 368–373.

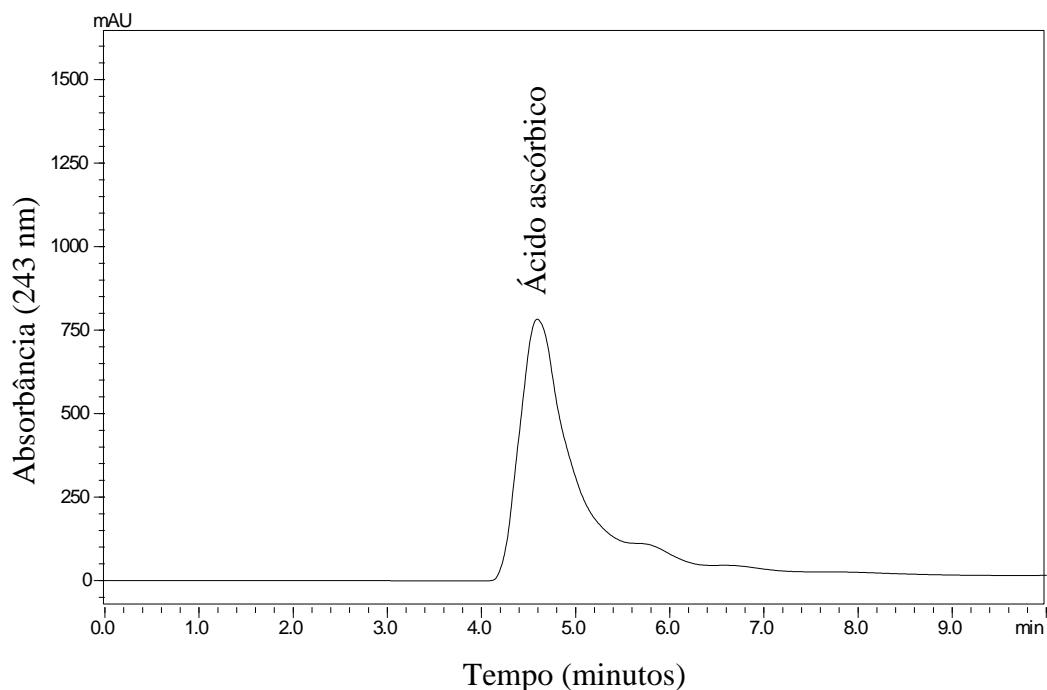
- Varela-Santos, E., Ochoa-Martinez, A., Tabilo-Munizaga, G., Reyes, J. E., Pérez-Won, M., Briones-Labarca, V., & Morales-Castro, J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 13–22.
- Vázquez-Gutiérrez, J. L., Plaza, L., Hernando, I., Sánchez-Moreno, C., Quiles, A., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2013). Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. *Food & Function*, 4(4), 586–591.
- Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M. J., Galotto, M. J., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., & Di Scala, K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 519–526.
- Venezuela, T. C. (2001). *Determinação de contaminantes metálicos (metal tóxico) em solo adubado com composto de lixo em área olerícola no município de Nova Friburgo*. Fundação Oswaldo Cruz.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic Compound Biochemistry* (p. 283). Dordrecht: Springer.
- Wang, L.-S., & Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269(2), 281–90.
- Wolfe, K. L., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang, Q., & Liu, R. H. (2008). Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8418–8426.
- Wu, S., Dastmalchi, K., Long, C., & Kennelly, E. J. (2012). Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7513–7525.
- Wu, S., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, 54(1), 148–159.
- Wu, S., Yin, Z., Zhang, J., Long, C., Kennelly, E. J., & Zheng, S. (2013). Bioactive and marker compounds from two edible dark-colored myrciaria fruits and the synthesis of jaboticabin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4035–43.
- Yamada, K. (2013). Cobalt: its role in health and disease. *Metal Ions in Life Science*, 13, 295–320.
- Yu, Y., Lin, Y., Zhan, Y., He, J., & Zhu, S. (2013). Effect of high pressure processing on the stability of anthocyanin, ascorbic acid and color of Chinese bayberry juice during storage. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 701–706.
- Zachos, F. E., & Habel, J. C. (Eds.). (2011). *Biodiversity Hotspots* (p. 546). Heidelberg: Springer-Verlag.

Zhang, Y., Butelli, E., & Martin, C. (2014). Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 19, 81–90.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316.

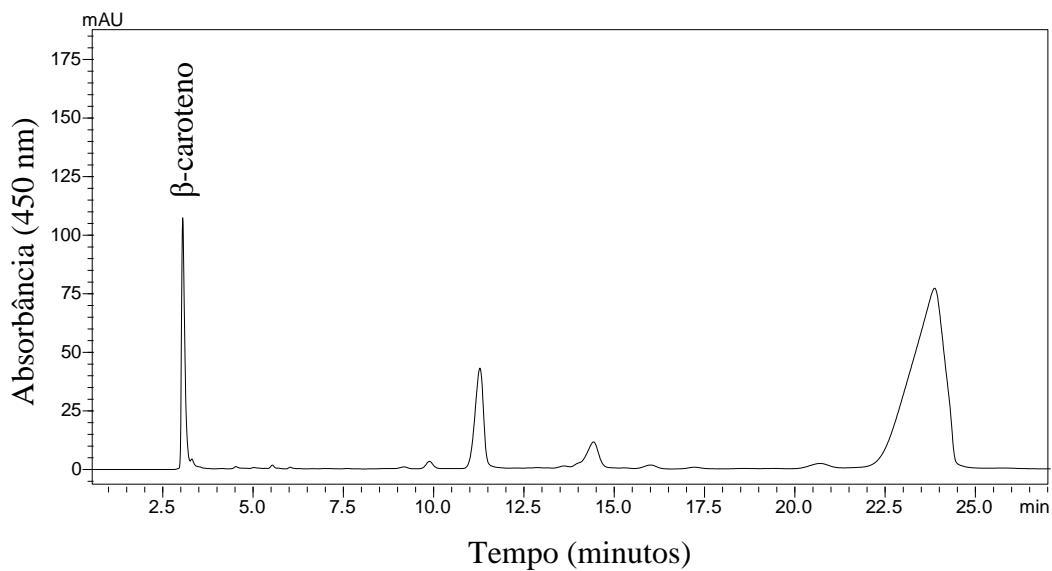
**Anexo 1**

Cromatograma do ácido ascórbico da polpa da jabuticaba



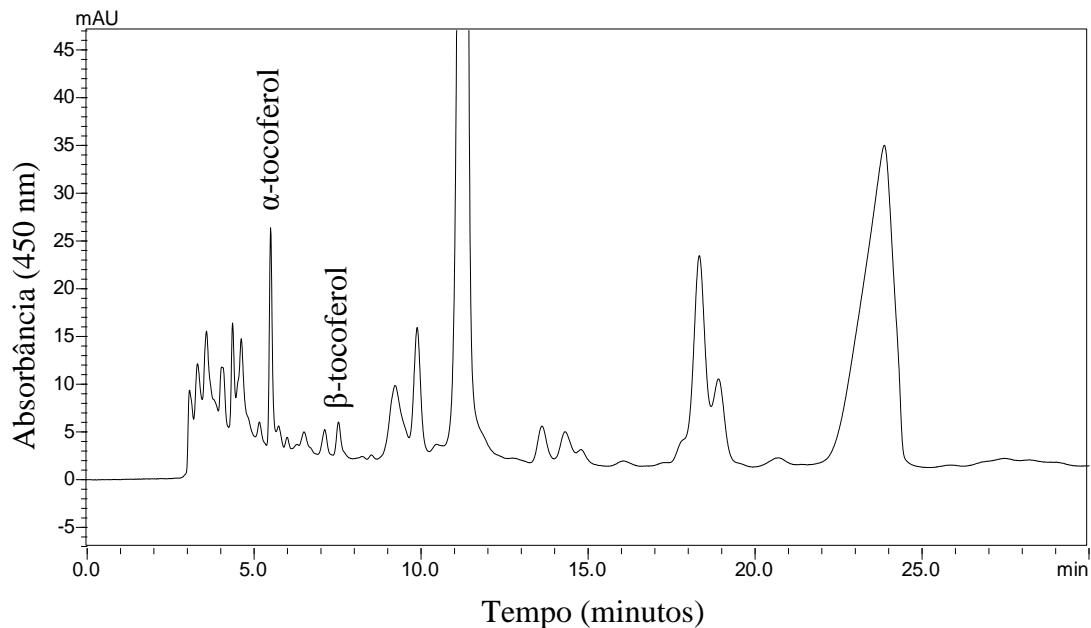
**Anexo 2**

Cromatograma do perfil de carotenoides da fruta inteira da jabuticaba



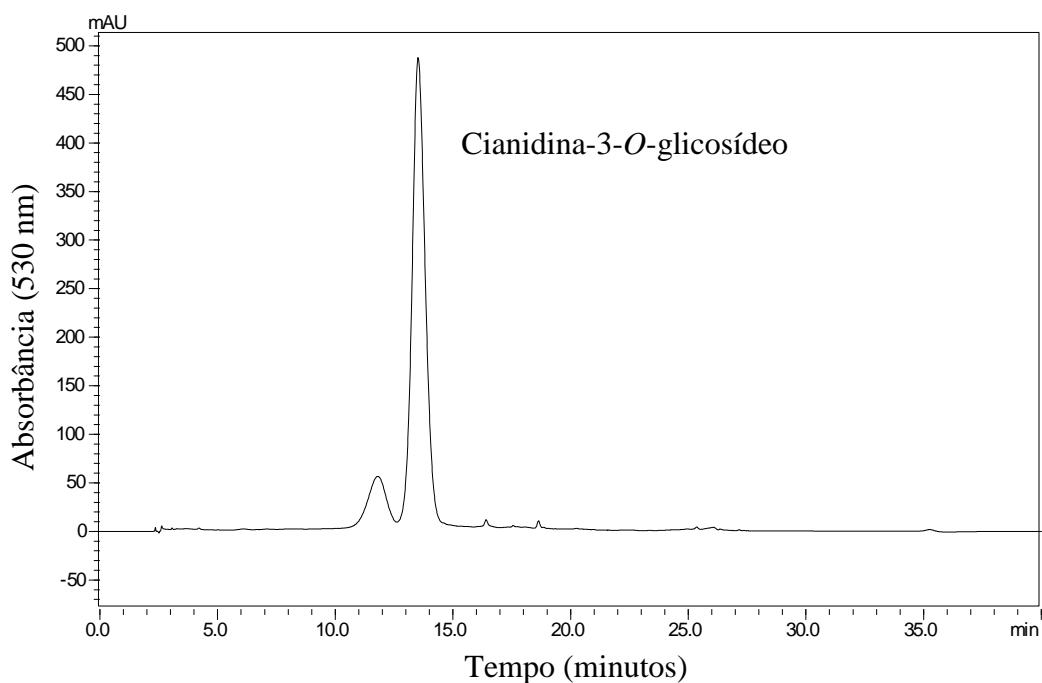
**Anexo 3**

Cromatograma do perfil de tocoferóis da fruta inteira da jabuticaba



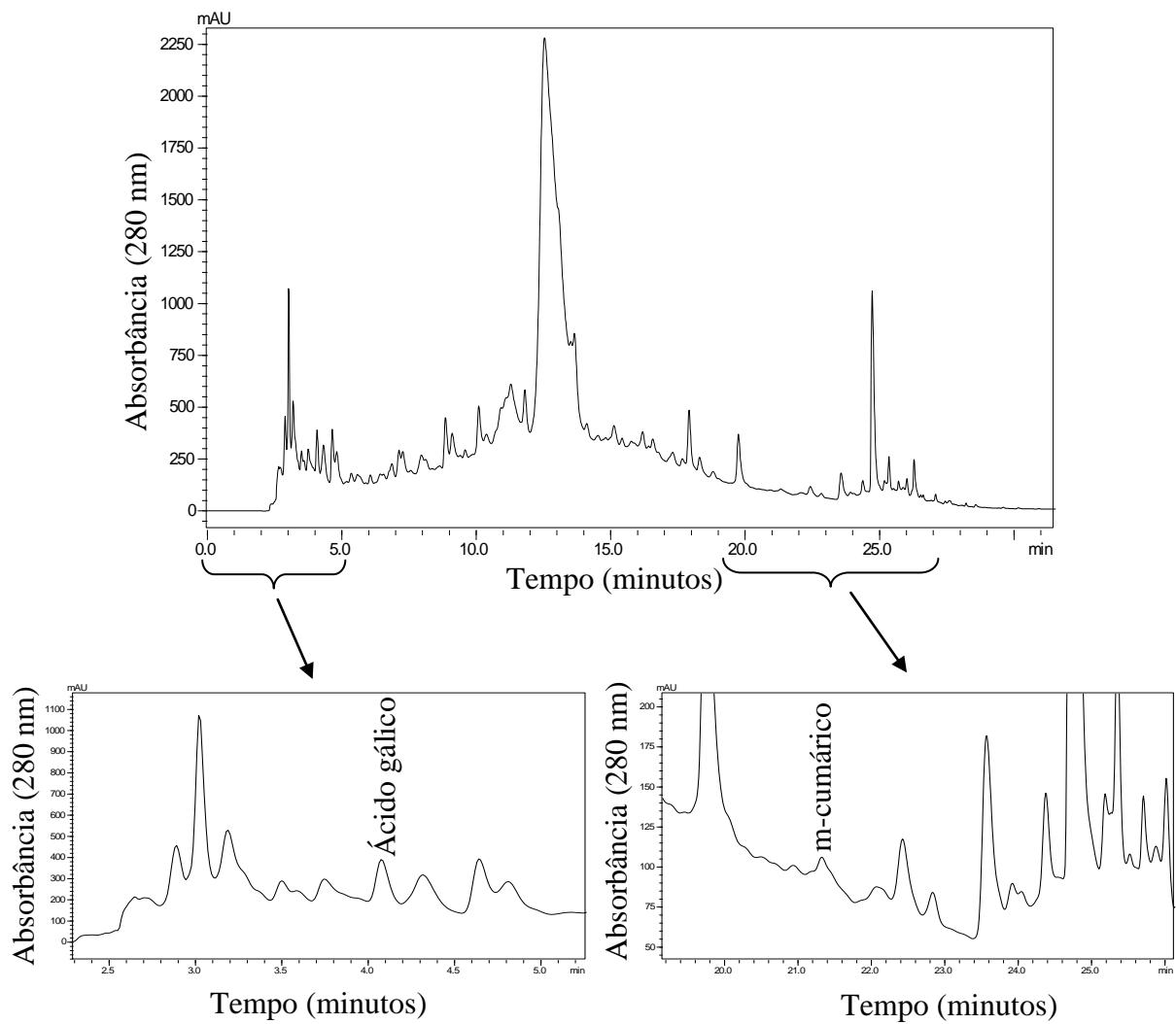
**Anexo 4**

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos antocianinas da fruta inteira da jabuticaba



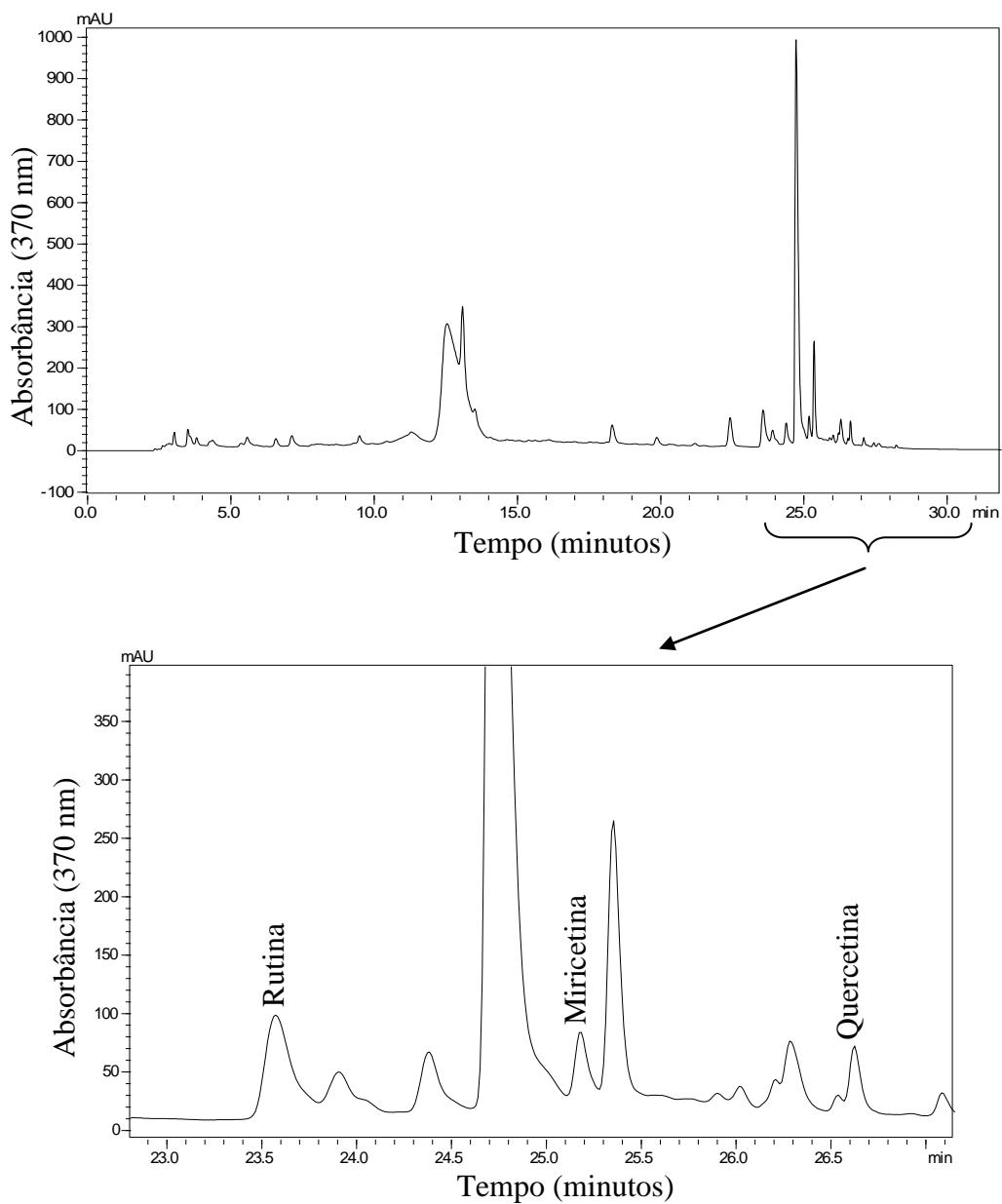
**Anexo 5**

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos  
da fração livre da casca da jabuticaba a 280 nm



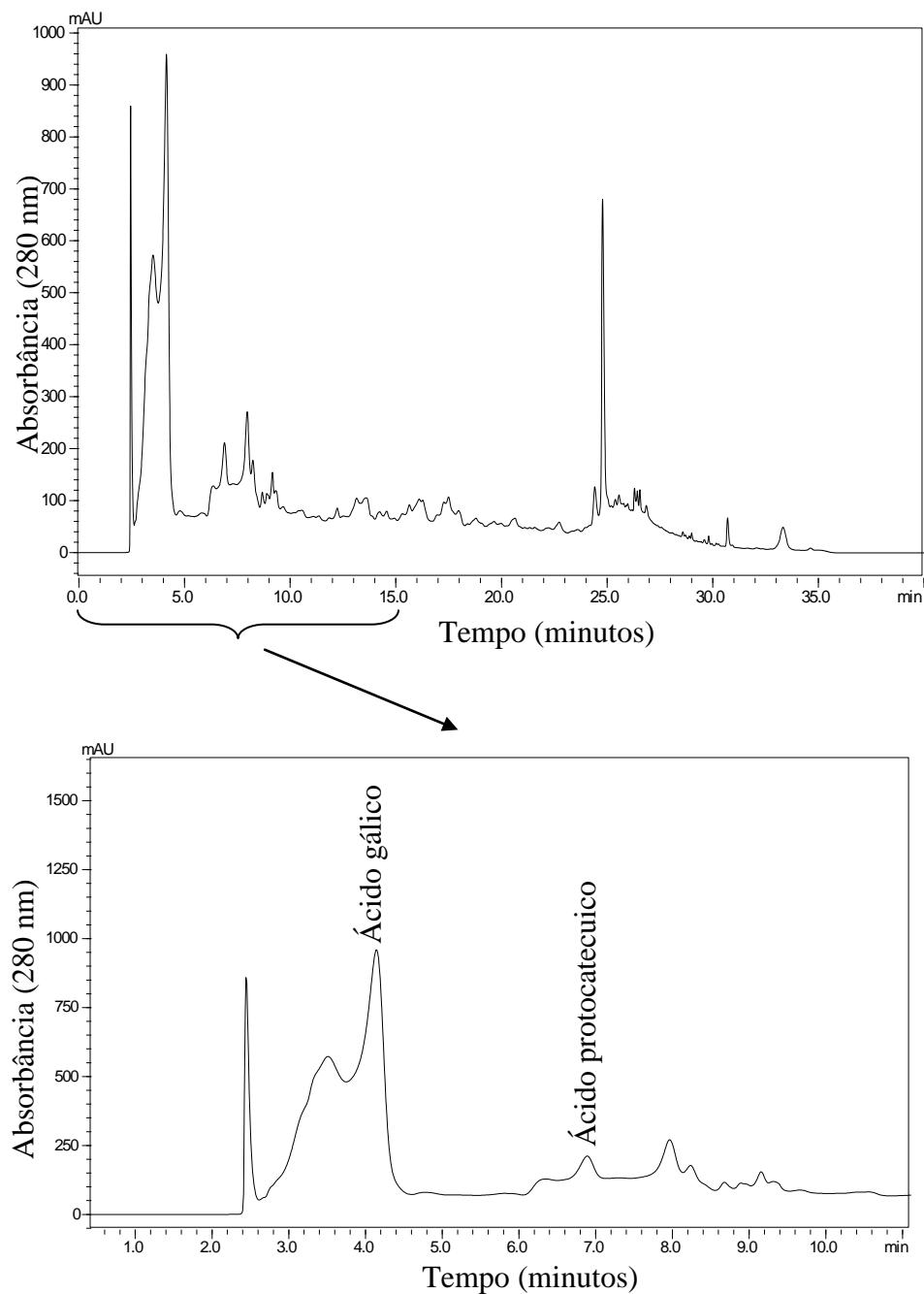
**Anexo 6**

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos  
da fração livre da casca da jabuticaba a 370 nm



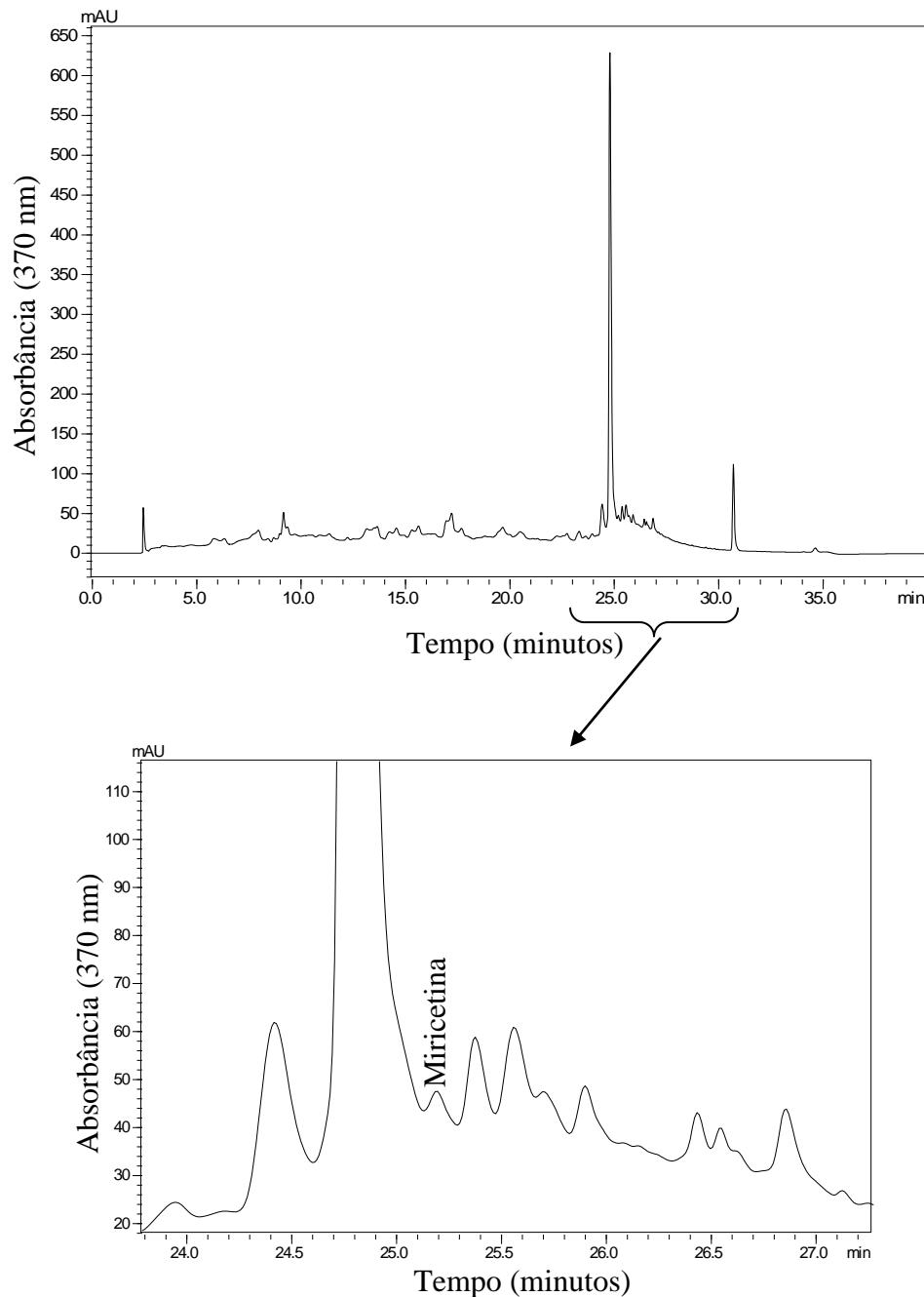
**Anexo 7**

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos  
da fração alcalina da casca da jabuticaba a 280 nm



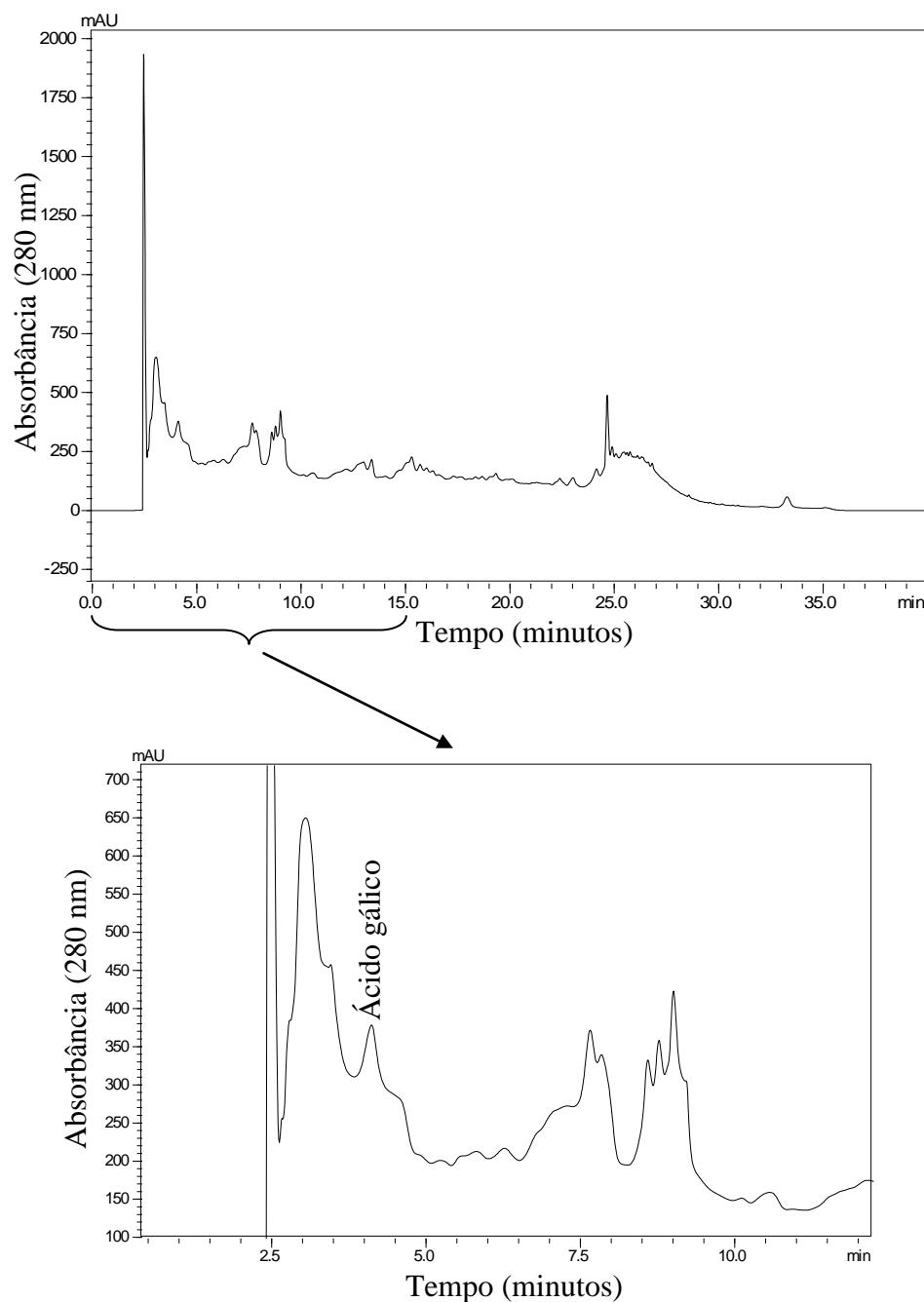
**Anexo 8**

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos  
da fração alcalina da casca da jabuticaba a 370 nm



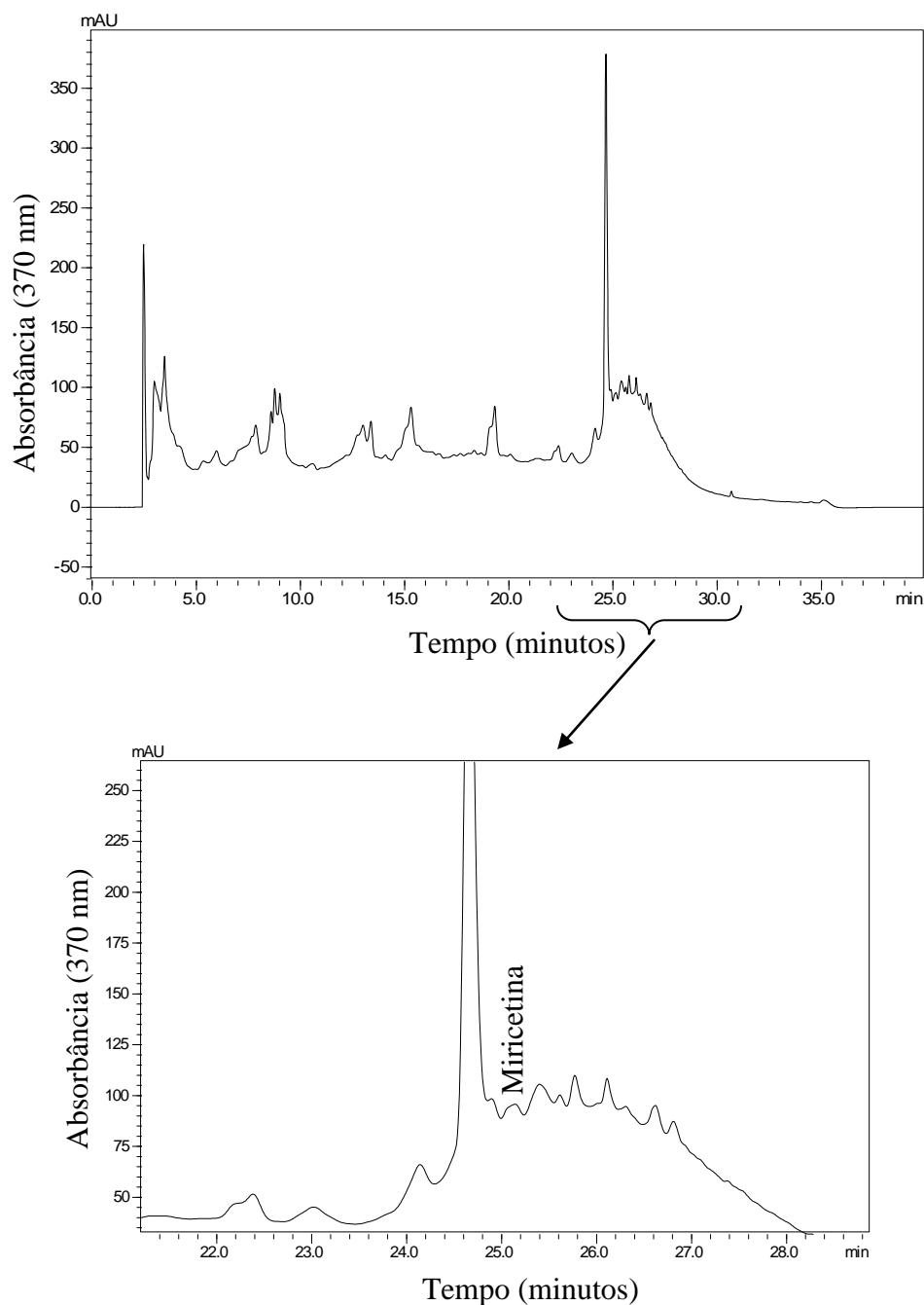
**Anexo 9**

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos  
da fração ácida da casca da jabuticaba a 280 nm



**Anexo 10**

Cromatograma do perfil de compostos fenólicos  
da fração ácida da casca da jabuticaba a 370 nm



## Anexo 11

Exemplo do questionário de hábito de consumo  
aplicado para a seleção dos voluntários da análise sensorial

Nome: _____		Idade: _____												
Sexo: ( )F ( )M		Naturalidade: _____												
Escolaridade: _____														
<p>1. Com que frequência você consome sucos de fruta (exceto sucos em pó, como: <i>tang, clight, fresh</i>)?</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th>1x semana</th> <th>2-3x semana</th> <th>4-5x semana</th> <th>Pelo menos 1x/dia</th> <th>Pelo menos 2x/dia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>( )</td> <td>( )</td> <td>( )</td> <td>( )</td> <td>( )</td> </tr> </tbody> </table>					1x semana	2-3x semana	4-5x semana	Pelo menos 1x/dia	Pelo menos 2x/dia	( )	( )	( )	( )	( )
1x semana	2-3x semana	4-5x semana	Pelo menos 1x/dia	Pelo menos 2x/dia										
( )	( )	( )	( )	( )										
<p>2. Quais sucos você tem hábito de consumir?          ( ) abacaxi    ( ) acerola    ( ) laranja    ( ) limão          ( ) manga    ( ) pêssego    ( ) uva          ( ) outros _____</p>														

### Anexo 12

Exemplo de ficha sensorial empregada para investigar a aceitação dos sucos

<p>Nº da amostra: _____</p> <p>Nome: _____</p> <p>Idade: _____ Sexo: F ( ) M ( )</p> <p>Estamos avaliando a aceitação sensorial do suco de jabuticaba. Marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto quanto aos atributos abaixo.</p> <p><b><u>Impressão global</u></b></p> <p>Indiferente</p> <p>Desgostei muitíssimo   Gostei muitíssimo</p> <p><b><u>Aroma</u></b></p> <p>Indiferente</p> <p>Desgostei muitíssimo   Gostei muitíssimo</p> <p><b><u>Sabor</u></b></p> <p>Indiferente</p> <p>Desgostei muitíssimo   Gostei muitíssimo</p> <p><b><u>Aparência</u></b></p> <p>Indiferente</p> <p>Desgostei muitíssimo   Gostei muitíssimo</p> <p><b><u>Textura</u></b></p> <p>Indiferente</p> <p>Desgostei muitíssimo   Gostei muitíssimo</p>
---