EFEITO DO BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS EM PÃES ADICIONADOS DE FARINHA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA)*

Paula Andrés Duarte

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.

Orientadores: Profa. Dra. Eliane Fialho de Oliveira
Profa. Dra. Mariana Costa Monteiro

Rio de Janeiro
Fevereiro, 2018

Duarte, Paula Andrés

Efeito do bioprocessamento enzimático sobre os compostos fenólicos em pães adicionados de farinha de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba)* / Paula Andrés Duarte. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2018.

xiii, 108 f.: 1l. ; 30 cm

Orientadores: Eliane Fialho de Oliveira e Mariana Costa Monteiro.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2018.

Referências bibliográficas: f. 82 - 101

1. Compostos fenólicos. 2. Antocianinas. 3. Atividade Antioxidante. 4. Farinha de jabuticaba. 5. Pães enriquecidos 6. Bioprocessamento. 7. Enzimas. 8. Nutrição. I. de Oliveira, Eliane Fialho. II. Monteiro, Mariana Costa. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. IV. Título.

EFEITO DO BIOPROCESSAMENTO ENZIMÁTICO SOBRE OS COMPOSTOS FENÓLICOS EM PÃES ADICIONADOS DE FARINHA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA)*

Paula Andrés Duarte

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.

Examinada por:

_____

Profª Drª Eliane Fialho de Oliveira, DSc
Instituto de Nutrição Josué de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

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

_____

Prof Dr. Daniel Perrone Moreira, DSc (revisor)
Instituto de Química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Profª Drª Nathalia Moura Nunes, DSc
Instituto de Nutrição
Universidade do Estado 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
Fevereiro, 2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer aos meus pais que me ajudaram a permanecer nessa luta até o final, sempre me dando muita força e auxilio de todas as formas possíveis, além de muito amor e carinho que eu precisei nos momentos em que achei que não ia conseguir. Acreditem, terminar um mestrado na UFRJ não é fácil.

Também queria agradecer a todos os meus irmãos, tios e tias, primos e primas, minhas dindas e toda a minha família por sempre me apoiar e estar presente para tudo que eu precisei, nos bons e maus momentos. Sei que sempre estarão lá para o que eu ainda vou precisar. Quero que saibam que isso é reciproco.

Queria agradecer aos meus amigos, meus irmãos que eu escolhi durante minha caminhada. Obrigada pessoal da escola, do curso do inglês, da escolinha do vôlei, da dança, de Guaratiba, da Tijuca, os amigos dos amigos que viraram meus amigos... todo mundo fez sua parte. Sério, só de não me chamar para sair porque sabia que eu estava escrevendo, ou no fundão, ou no laboratório, já ajudou para eu não cair na tentação.

Também não posso deixar de agradecer do fundo do meu coração, juntamente com um pedido de desculpas, as minhas queridas orientadoras Mariana Monteiro e Eliane Fialho, que tiveram a paciência de me guiar durante essa estrada árdua que foi até chegar aqui. Eu realmente me senti perdida em alguns momentos e se não fosse por elas, não sei o que seria de mim. Espero que nosso trabalho alcance as expectativas e ajude muitas pessoas e cientistas no futuro. Não consigo descrever o orgulho que tem sido ter vocês como orientadoras. Fatalmente é uma história que irei contar aos meus netos: “Sabe aquelas duas grandes cientistas da UFRJ que vocês estão vendo? Foram minhas professoras”. É... olha só onde eu cheguei.

E é claro que não posso deixar de agradecer a todos do laboratório J-13, do LABAFs e do LBNA que sempre acompanharam a minha jornada e se tornaram verdadeiros parceiros, alguns desde a graduação. Tanto os professores quanto os alunos, todos foram incríveis e prestativos, me ajudaram nas análises e me emprestaram o espaço para tais. Vão morar no meu coração e marcaram minhas memórias para sempre.

Obrigada a todos, obrigada UFRJ.

RESUMO

DUARTE, PAULA ANDRÉS. Efeito do bioprocessamento enzimático sobre os compostos fenólicos em pães adicionados de farinha de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba).* Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O pão integral, por ser composto, majoritariamente, de farinha de trigo integral, contém mais fibras, vitaminas, minerais e fitoquímicos quando comparado ao pão branco. Porém, a maioria dos consumidores prefere os produtos elaborados com farinha de trigo refinada, devido a textura e o sabor. O bioprocessamento de alimentos pode configurar uma estratégia para melhorar esses atributos sensoriais dos pães e é caracterizado pela transformação de matérias-primas em produtos próprios para o consumo a partir de células vivas ou componentes de sua maquinaria bioquímica. Os mais conhecidos incluem o uso de microrganismos (fermentação) e de enzimas. Atualmente, sabe-se que a utilização de enzimas em pães pode, além de melhorar a qualidade sensorial destes, aumenta o teor de compostos fenólicos. A jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*) é uma fruta brasileira rica em compostos fenólicos, geralmente, é consumida fresca, porém começa a fermentar cerca de 3 a 4 dias após sua colheita. Por essa razão, é utilizada para produção de sucos, geleias, tortas, vinhos e licores. No entanto, durante o processamento, grande quantidade de subprodutos (cascas e sementes) é gerada e descartada. Atualmente, as frutas e seus subprodutos são utilizados para obtenção de farinhas e estas possuem possível aplicação em pães na substituição parcial da farinha de trigo, para enriquecê-los com compostos bioativos. Nesse contexto, se torna relevante o presente trabalho que avaliou o efeito do bioprocessamento enzimático sobre as características tecnológicas e os teores de compostos fenólicos (CF) em pães adicionados de farinha do subproduto da jabuticaba. Parâmetros físico-químicos, composição centesimal, capacidade antioxidante (CA) e teores de compostos fenólicos foram avaliados na farinha do subproduto da jabuticaba (FJ) e nos pães (controle com 100% de farinha de trigo integral – PC; controle com substituição de 10% da farinha de trigo pela FJ – PJ; bioprocessado com 100% de farinha de trigo integral – PB; e bioprocessado com substituição de 10% da farinha de trigo pela FJ – PJB). Quando avaliadas por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência) foram analisadas as frações solúveis e insolúveis. A aceitação sensorial e a intenção de compra dos pães

também foram avaliadas. A enzima utilizada no bioprocessamento foi a xilanase. Ao longo de 90 dias de armazenamento, as farinhas apresentaram redução nos teores de CF e a CA, respectivamente de 47% e 81%, assim como foi observada coloração mais escura e menos avermelhada/arroxeada, devido à degradação das antocianinas. O PJ apresentou maior CA e teores mais elevados de resíduo mineral fixo do que PI. Quando analisado por CLAE, observa-se que o PJ possui três vezes mais compostos fenólicos do que o PI. Além disso, ao se coccionar o PJ foi possível observar um aumento de CF na fração solúvel do alimento. O PIB apresentou volume maior e densidade menor quando comparado ao PI. O contrário foi observado para PJ e PJB. O bioprocessamento não alterou o pH dos pães, mas resultou em coloração mais escura. Na fração solúvel, a CA se manteve constante entre o PI e o PIB, porém aumentou entre o PJ e o PJB. O mesmo foi observado para a distribuição dos CF. A análise sensorial dos pães integrais sem FJ mostrou que, tanto o controle quanto o bioprocessado, obtiveram notas superiores, na maioria dos atributos avaliados, quando comparado aos pães de jabuticaba. Porém, os pães de jabuticaba se mantiveram acima na média mínima de aceitação. Conclui-se que a adição da FJ enriquece o pão com compostos fenólicos e atividade antioxidante, e a adição da enzima melhora as características do pão do ponto de vista bioativo, o que sugere um produto com possíveis benefícios à saúde.

Palavras-chave: compostos fenólicos, antocianinas, atividade antioxidante, farinha de jabuticaba, pães enriquecidos, bioprocessamento.

Effect of the enzymatic bioprocessing on the phenolic compounds in breads added with flour of jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*)

Whole bread is composed of whole wheat flour that contains more fiber, vitamins, minerals and phytochemicals than refined white bread. However, most consumers prefer products made from refined wheat flour, since the texture and flavor properties of their wheat bran are considered to be less attractive. The food bioprocessing can set up a strategy to improve these sensory attributes of breads and characterized by the transformation of raw materials into products suitable for consumption from living cells or components of their biochemical machinery. The best known are fermentation and enzymatic bioprocessing. Both are used on a large scale in the production of bakery products. Currently, it is known that the use of enzymes in breads positively affects the content of phenolic compounds and improves the sensory quality. The jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*) is a Brazilian fruit rich in phenolic compounds and usually consumed fresh, but it begins to ferment for 3-4 days after harvest. Therefore, it is generally used to produce juices, jellies, pies, wines and, spirits. However, during processing, a large amount of residue (peel and seeds) is generated, which is discarded. In this context, the application of drying in oven dehydration for the elaboration of jabuticaba flour (JF) as a source of phenolic compounds (PC) becomes relevant. Currently, fruits and their residues are used to obtain flours and these have a potential application in breads in the partial substitution of wheat flour, to enrich them with bioactive compounds. In this context, the present study evaluated the effect of enzymatic bioprocessing on the technological characteristics and the phenolic compounds (PC) contents on bread added with flour of the by-product of jaboticaba. The physical and chemical parameters, centesimal composition, antioxidant capacity (AC) and PC contents were evaluated in the JF and in the breads (control with 100% of whole wheat flour - PI, control with 10% substitution of wheat flour by JF - PJ, bioprocessed with 100% whole wheat flour - PIB, and bioprocessed with 10% substitution of wheat flour by JF - PJB), as well as a sensorial analysis was also carried out on bread. When evaluated by HPLC soluble and insoluble fractions were analysed. Sensory acceptance and purchase intent of the breads were also evaluated. The enzyme used in the bioprocessing was xylanase. During 90 days of storage, the flours presented a reduction of PC contents and AC 47% and 81%, respectively, as well as darker and less reddish / purplish staining due to anthocyanin degradation. The PJ had higher AC

and mineral residue than PI. When analyzed by HPLC, it is observed that PJ has 3 times more PC content than in PI. In addition, when cooking the PJ, it was possible to observe an increase of PC in the soluble fraction of the product. PIB obtained higher volume and lower density than PI. The opposite was observed for PJ and PJB. The bioprocessing did not alter the pH of the breads, but left PIB and PJB darker. In the soluble fraction, AC remained constant between PI and PIB, but increased between PJ and PJB. The same occurred in the distribution of PC. The sensory analysis of wholebreads with JF showed that both control and bioprocessed, obtained higher grades in most aspects evaluated when compared to the jabuticaba breads. However, the jabuticaba breads remained unchanged in the minimum acceptance mean among the scales used. It is concluded that the addition of JF enriches the bread and the effect of the addition of the enzyme improves the characteristics of the bread from the bioactive point of view, which suggests a product with possible health benefits.

Key words: phenolic compounds, anthocyanins, antioxidant activity, jabuticaba flour, enriched breads, bioprocessing

SUMÁRIO

Revisão Bibliográfica ..... **Pág**
1. Produto de panificação 2
2. Compostos fenólicos 5
2.1. Antocianinas 10
3. Jabuticaba.*(Myrciaria jaboticaba*) 13
3.1. Aspectos botânicos, consumo e comercialização 13
3.2. Caracterização química 14
3.3. Potenciais efeitos benéficos à saúde 15
4. Bioprocessamento 16
Justificativa 20
Objetivos 22

Capitulo 1. **Pães integrais enriquecidos em compostos fenólicos por meio da adição de farinha de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba)*** 24
1. Introdução 25
2. Material e métodos 27
3. Resultados e discussão 35
4. Conclusão 51

Capitulo 2. Efeito do bioprocessamento em pães adicionados de farinha de jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba)* 53
1. Introdução 55
2. Material e métodos 57
3. Resultados e discussão 65
4. Conclusão 80
Considerações finais 81
Referências bibliográficas 82

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic
ANOVA	Análise de Variância
AX	Arabinoxilano
BS	Base seca
CA	Capacidade Antioxidante
CF	Compostos fenólicos
CADEG	Central de Abastecimento do Estado da Guanabara
CLAE	Cromatografia liquida de alta eficiência
DAD	Diode array detector
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FJ	Farinha do subproduto da jabuticaba
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
INC	Informação nutricional complementar
LDL	Low density lipoprotein
MS	Mass spectrometry
OMS	Organização mundial da saúde
PB	Pão bioprocessado
PJB	Pão de jabuticaba bioprocessado
PC	Pão controle
PJ	Pão de jabuticaba
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazine
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1. Elementos estruturais de AX: (A): resíduo de D-xilopiranosil; (B): resíduo de D-xilopiranosil substituído em C(O)-2 com um resíduo de L-arabinofuranosil; (C): resíduo de D-xilopiranosil substituído em C(O)-3 com um resíduo L-arabinofuranosil; (D): resíduo D-xilopiranosil substituído em C(O)-2 e C(O)-3 com resíduos L-arabinofuranosil. A estrutura C mostra a ligação do ácido ferúlico a C(O)-5 de um resíduo de L-arabinofuranosil 3

Figura 2. Classificação dos fitoquímicos dietéticos 5

Figura 3. Estrutura química básica dos ácidos hidroxibenzóicos (A), dos ácidos hidroxicinâmicos (B), dos flavonoides (C) e a estrutura básica de um composto fenólico (D) 6

Figura 4. A estrutura química do ácido ferúlico 8

Figura 5. Estrutura da amilopectina [polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α-(1-4) e α-(1-6)] 10

Figura 6. Estrutura básica das principais antocianidinas e grupamentos para formação das diferentes antocianinas encontradas na natureza 11

Figura 7. Fruto da jabuticabeira (jabuticaba madura) 14

Figura 8. Principais componentes morfológicos de uma semente de trigo. (a) seção longitudinal; (b) seção transversal; (c) segmento da camada de farelo com células de aleurona e endosperma. E, epiderme; H, hipoderme; I, pericarpo interno; C, células cruzadas; TC, células de tubo; T, testa; N, nucelar camada; A, camada de aleurona; EN, endosperma; PE, células periféricas do endosperma; PR, células prismáticas do endosperma; SE, epitélio escutelar; S, escutelo ; EM, embrião 18

Capítulo 1

Tabela 1. Composição centesimal da farinha do subproduto da jabuticaba 35

Tabela 2. Teores de compostos fenólicos (mg/100g, bs) da farinha do subproduto da jabuticaba o longo 90 dias de armazenamento 38

Tabela 3. Composição centesimal dos pães elaborados (g/100g, bs) 43
Tabela 4. pH e coordenadas colorimétricas das massas cruas e dos pães elaborados 45
Tabela 5. Teor de compostos fenólicos (mg/100g, bs) nas massas cruas e nos pães elaborados. 48
Tabela 6. Perfil sensorial do pão de jabuticaba e do pão integral, (*n*=100) 51
Figura 1. Coordenadas colorimétricas avaliadas por *L** (**A**), **a* (**B**) e **b* (**C**) na farinha do subproduto da jabuticaba ao longo de 90 dias de 37 armazenamento .....
Figura 2. Capacidade antioxidante determinada pelos métodos FRAP (A), TEAC (B) e *Folin-Ciocalteu* (C) na farinha do subproduto da jabuticaba ao longo de 90 dias de armazenamento 41
Figura 3. Capacidade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP (A), TEAC (B) e *Folin-Ciocalteu* (C) nas massas cruas e nos pães elaborados 50

Capítulo 2

Tabela 1. Atividade celulolítica, amilolítica e xilanolítica dos preparados enzimáticos. 66
Tabela 2. Concentrações e atividades das enzimas empregadas para elaboração do pão integral bioprocessado 66
Tabela 3. Teor de ácido ferúlico (mg/100g, bs) nos pães integrais controle e adicionados de enzimas 69
Tabela 4. pH e coordenadas colorimétricas dos pães integrais e de jabuticaba controles e bioprocessados 72
Tabela 5. Teores dos Compostos fenólicos (mg/100g, bs) nos pães integral e adicionado da farinha do subproduto da jabuticaba controle e bioprocessados 74
Tabela 6. Capacidade antioxidante dos pães integrais e de jabuticaba controle e bioprocessados determinada pelos métodos de Folin-Ciocalteu, FRAP e TEAC 78
Tabela 7. Perfil sensorial dos pães de jabuticaba e integral controles e bioprocessados (*n*=100). 79
Figura 1. Volume (**A**) e densidade (**B**) dos pães bioprocessados com diferentes concentrações dos preparados enzimáticos. 67

Figura 2. Volume (**A**) e densidade (**B**) dos pães adicionados de diferentes enzimas em comparação ao pão controle (sem adição de enzima) expressos em cm³ e g/cm³, respectivamente 69

Figura 3. Volume (**A**) e densidade (**B**) dos pães elaborados. Resultados expressos como média±desvio padrão de triplicata 70

Anexos

Anexo 1. Análise sensorial de pães integrais elaborados com farinha do subproduto da jabuticaba 104

Anexo 2. Análise sensorial de pães de forma integral elaborados 105

Anexo 3. Intenção de consumo e compra dos pães de forma integral 108

Anexo 4. Termo de consentimento livre e esclarecido 109

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Produtos de panificação

Os produtos de panificação, como pães, biscoitos, massas, entre outros são consumidos diariamente e em grande quantidade pela população mundial, constituindo uma das principais fontes energéticas da dieta (UCHOA et al., 2009; KTENIOUDAKI and GALLAGHER, 2012). O pão é considerado globalmente importante do ponto de vista nutricional por ser fonte de proteínas, fibra dietética, vitaminas, micronutrientes e antioxidantes (DEWETTINCK et al., 2008).

Contrariamente ao pão integral, que é relativamente rico em fibras (7% a 8% de matéria seca), o pão branco contém apenas 2% a 3% de fibra. As fibras, e mais particularmente as solúveis, como a inulina e oligofrutoses, podem ajudar a prevenir doenças como infecções intestinais, câncer de cólon retal, obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes tipo II (POINOT et al., 2010).

Normalmente, os consumidores preferem os produtos elaborados com farinha de trigo refinada do que com farinha integral, já que as propriedades sensoriais, como a textura e o sabor dos produtos elaborados com essas farinhas são menos atraentes. Então, a indústria de alimentos busca melhorar as características sensoriais dos produtos elaborados com farinha de trigo integral para estimular o consumo desses produtos no mercado (CODA et al., 2015).

Durante a cocção, a temperatura no interior do pão atinge cerca de 99 °C. A estrutura cristalina do amido se apresenta na forma de dupla hélice, as quais são densamente envolvidas por em uma rede monocíclica. Ao realizar o processamento térmico ocorre a formação de um complexo amido-glúten, formado por proteínas do glúten (gliadina e glutenina), principalmente pela subunidade glutenina, gerando ligações dissulfito intermoleculares necessárias para a transformação da massa (MIHHALEVSKI et al., 2012).

Este complexo também se forma devido ao amido, que ao longo do processo apresenta grânulos parcialmente inchados e gelatinizados. Uma parte dos polímeros de amido (amilose e também amilopectinas degradadas) lixiviam do grânulo formando uma rede de emaranhamento de amido gelatinizado entre a matriz de glúten (HUG-ITEN et al., 1999). A hidratação e a sova resultam no desenvolvimento de uma matriz estabilizada com o glúten que retém o dióxido de carbono produzido pela fermentação e a água acrescentada na formulação. O desenvolvimento de gás durante o processo de

sova e cozimento é responsável pelo desenvolvimento do volume e textura do pão (HOSENEY, 2010).

A farinha de trigo integral é rica em fibras dietéticas, dentre elas estão os arabinoxilanos (AX). Os arabinoxilanos consistem principalmente em uma cadeia de xilano ligada a um resíduo de *D*-xilopiranosil por ligação do tipo β-1,4. O monômero α-L-arabinofuranosídeo pode estar presente na posição C(O)-3 e/ou C(O)-2 . O ácido ferúlico também pode estar presente na estrutura acoplado à C(O)-5 da arabinose através de uma ligação éster (**Figura 1**). Em AX de trigo, aproximadamente 66% dos resíduos de xilose formam a cadeia principal. As estruturas de AX solúveis e insolúveis em água são semelhantes, mostrando apenas pequenas diferenças no peso molecular e na razão α-L-arabinofuranosídeo e D-xilopiranosil (COURTIN & DELACOUR, 2002; KOEGELENBERG & CHIMPHANGO, 2017).

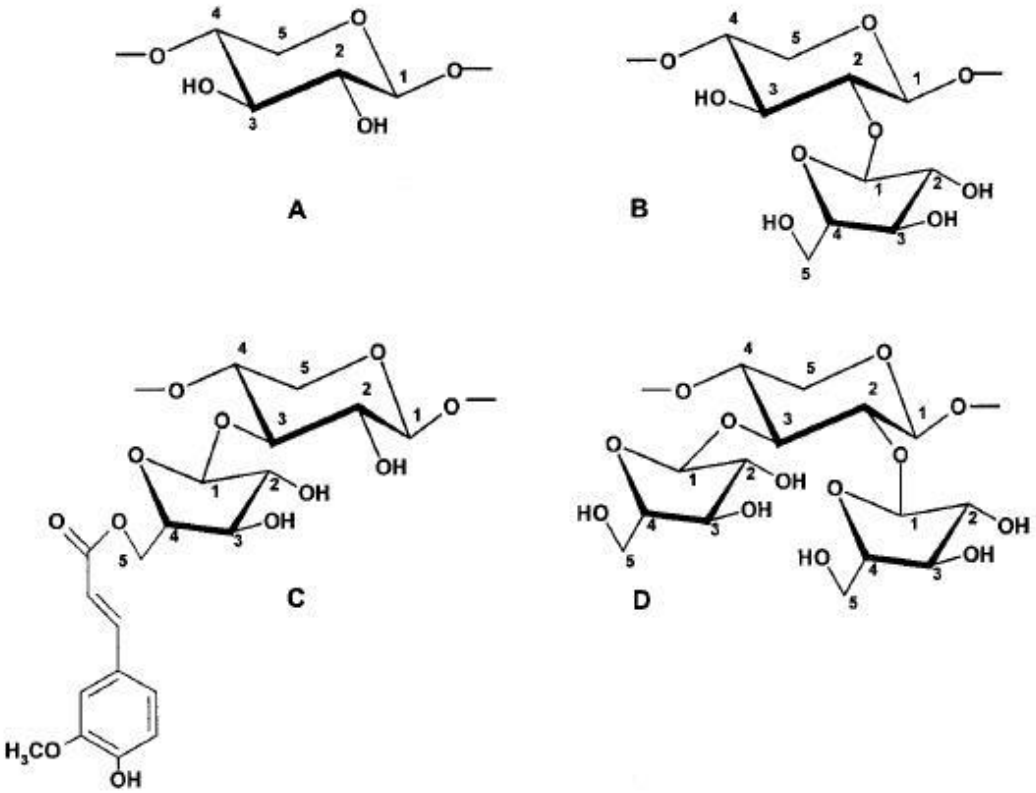

Figura 1. Elementos estruturais de AX: (A): resíduo de D-xilopiranosil; (B): resíduo de D-xilopiranosil substituído em C(O)-2 com um resíduo de L-arabinofuranosil; (C): resíduo de D-xilopiranosil substituído em C(O)-3 com um resíduo L-arabinofuranosil; (D): resíduo D-xilopiranosil substituído em C(O)-2 e C(O)-3 com resíduos L-arabinofuranosil. A estrutura C mostra a ligação do ácido ferúlico a C(O)-5 de um resíduo de L-arabinofuranosil (Adaptado de COURTIN & DELCOUR, 2002).

Os AX exercem efeito direto no processo de panificação, e estes efeitos se encontram mais evidentes durante a cocção. A água absorvida pelo L-arabinofuranosídeo do AX também influencia a distribuição da umidade entre os constituintes da massa, resultando em propriedades reológicas modificadas e tempo de mistura prolongado. A redistribuição da umidade entre glúten e outras moléculas permite que os AX reajam diretamente com moléculas de glúten, gerando uma nova rede entre glúten e AX (SIVAM et al., 2010). Além disso, a ligação entre as moléculas de ácido ferúlico e AX gera o aumento da viscosidade. A interação com as proteínas do meio, durante a cocção, também aumenta a viscosidade, uma vez que os AX ajudam a reduzir a perda de água e a manter o volume e a maciez do produto, pois estabiliza a quantidade de líquido drenado para o interior da massa (COURTIN & DELCOUR, 2012). De forma sucinta, os AX agem aumentando a viscosidade e, consequentemente, a umidade, a maciez e o tempo de prateleira do produto.

As frutas e seus subprodutos têm sido amplamente utilizados para a obtenção de farinhas (NUNES et al., 2016; SAVLAK et al., 2016). Estas possuem potencial de aplicação em produtos de panificação na substituição parcial da farinha de trigo, com o intuito de enriquecê-los do ponto de vista bioativo (UGWUONA et al., 2013; COELHO et al., 2017). O principal problema em relação ao uso das farinhas de frutas em quantidades maiores é a qualidade de cozimento devido à falta de proteínas de glúten e ao alto teor de β-glucano e outras fibras dietéticas (HO et al., 2013).

Na farinha de trigo integral, todos os componentes anatômicos do grão, como endosperma, farelo e germe estão presentes nas mesmas proporções existentes na forma intacta do grão. Assim, esse tipo de farinha contém substancialmente mais fibras, vitaminas, minerais e compostos fitoquímicos quando comparado com a farinha de trigo refinada. Consequentemente, a farinha de trigo integral é considerada uma excelente fonte de ingredientes nutricionais e funcionais para a saúde humana, pois apresenta muitos benefícios associados, incluindo a redução do risco de doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade e câncer (LIU, 2007).

Os cereais contêm compostos fenólicos, que não apenas agem contra os radicais livres de sistemas biológicos, mas também evitam a deterioração dos alimentos (SIVAM et al., 2010). Em relação aos compostos fenólicos, sabe-se que o ácido ferúlico é o mais abundante na farinha de trigo integral (ANSON et al., 2009; HEMERY et al., 2010; NORDLOUND et al., 2013). Afirma-se que o ácido ferúlico, pelo seu elevado

poder antioxidante, tem a capacidade de diminuir o risco de desenvolvimento de doenças, como câncer e diabetes (BOZ 2015; MANCUSO et al., 2014).

2. Compostos fenólicos

Os fitoquímicos são definidos como compostos não nutritivos de plantas em frutas, grãos e outros alimentos vegetais que foram associados à redução do risco de diversas doenças crônicas não transmissíveis (LIU, 2004). Estes podem ser classificados em: carotenoides, compostos fenólicos, alcaloides, compostos não-nitrogenados e compostos organosulfurados (**Figura 2**). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, amplamente distribuídos nos alimentos e são caracterizados por apresentarem uma ou mais hidroxilas ligadas diretamente a um anel benzênico (**Figura 2D**), estrutura na qual todo o grupo de compostos se baseia (VERMERRIS & NICHOLSON, 2006). Eles estão envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por agentes patogênicos (BOZ, 2015). Porém, no organismo humano, diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos compostos fenólicos, tais como antialérgica, anti-aterosclerótica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, anticancerígena e cardioprotetora (BALASUNDRAM et al., 2006; REYNERTSON et al., 2006; SHAHIDI et al., 2015). A maioria das propriedades citadas anteriormente é atribuída aos compostos fenólicos devido a sua capacidade de redução contra o estresse oxidativo.

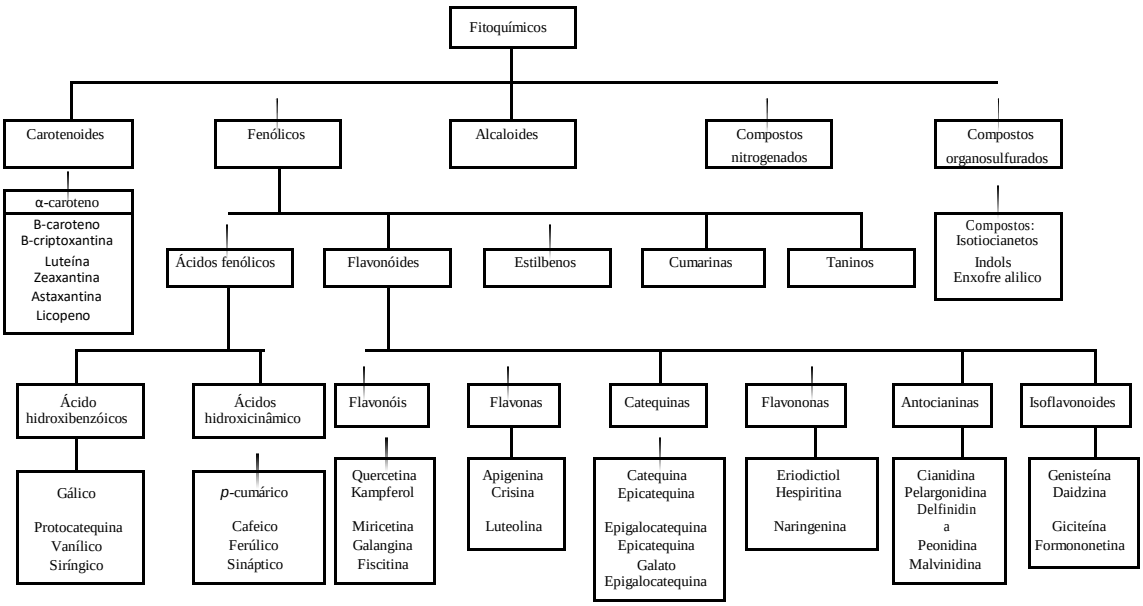

Figura 2. Classificação dos fitoquímicos dietéticos (Adaptado de LIU 2004).

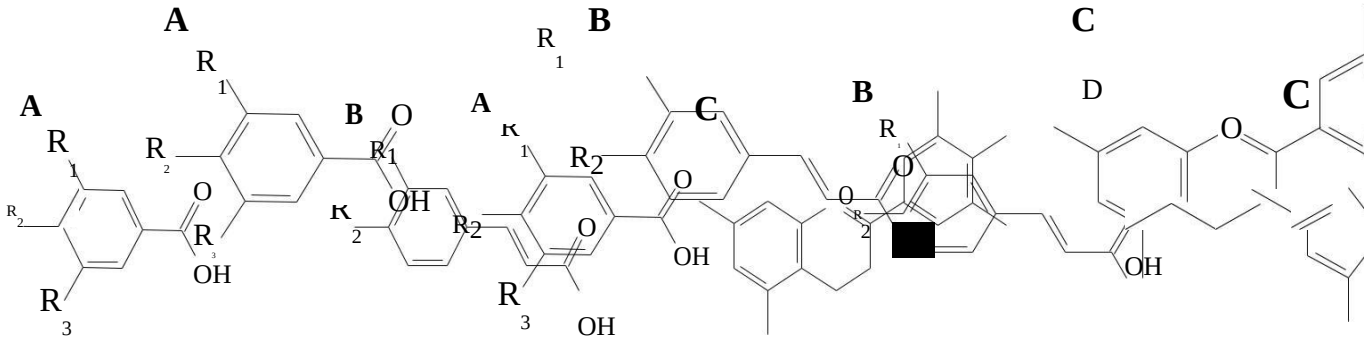

Figura 3. Estrutura química básica dos ácidos hidroxibenzóicos (**A**), dos ácidos hidroxicinâmicos (**B**), dos flavonoides (**C**) e a estrutura básica de um composto fenólico (**D**) (Adaptado de MANACH et al., 2004; VERMERRIS & NICHOLSON, 2006).

Espécies reativas derivadas de uma ampla gama de reações biológicas no organismo podem danificar as biomoléculas essenciais. A produção de grandes quantidades desses fatores negativos e a queda da proteção contra os mesmos, gera o estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (ROS) incluindo o superóxido (O^{-2}), a radical hidroxila (OH), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os peróxidos lipídicos têm sido associados a doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Antioxidantes naturais, tais como, flavonoides, tocoferóis e ácidos fenólicos podem melhorar a aumentar a proteção contra o estresse oxidativo no organismo humando (SIVAM et al., 2010).

Quimicamente, os flavonoides são constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) ligados através de três carbonos que, em suma, formam um heterociclo oxigenado (anel C). Este anel C é característico de cada subfamília. Entre as subfamílias, os monômeros diferem no tipo, localização e número de substituintes (por exemplo, hidroxilas) e alguns flavonoides podem também formar oligômeros (OTEIZA et al., 2017). Os diferentes radicais, assim como suas posições relativas à molécula, determinam sua ação biológica. A atividade benéfica dos flavonoides tem sido reconhecida desde há muito tempo, uma vez que os poderosos antioxidantes são eficazes contra muitas doenças, incluindo tumores, alergias e diferentes distúrbios mediados por radicais livres (SENGUPTA et al., 2005).

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Os ácidos cafeico, sinápico, ferúlico e *p*-cumárico são derivados de ácido hidroxicinâmico (**Figura 3**). Estes compostos se apresentam, na maioria das vezes, em suas formas insolúveis porque eles estão ligados às estruturas

celulares das plantas (ADOM & LIU 2002; WANG et al., 2013). Os ácidos *p*-cumárico, caféico e ferúlico são os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns e raramente são encontrados na sua forma livre nos alimentos. As formas conjugadas são glicosiladas ou formadas por ligações éster. A ligação do ácido caféico com o ácido quínico forma o ácido clorogênico. (DINELLI et al., 2009; VERMA et al., 2009; WANG et al., 2013).

Os compostos fenólicos são encontradoss na natureza, sendo suas principais fontes as frutas, as hortaliças e os cereais integrais (XU et al., 2017). A jabuticaba e o trigo possuem vários compostos fenólicos em sua composição. A seguir, serão caracterizados os compostos mais abundantes presentes nesses alimentos.

O ácido elágico, estruturalmente, apresenta quatro anéis aromáticos, que representam o domínio lipofílico; quatro grupos fenólicos e duas lactonas, que possuem moléculas de hidrogênio que atuam como aceptores de elétrons, e que representam o domínio hidrofílico (SEPÚLVEDA et al., 2011). Esse composto fenólico apresenta elevada capacidade antioxidante, por meio da doação de átomos de H^+ do seu grupo fenol para radicais. Na última década, vários estudos *in vitro* relataram o efeito anti-aterogênico, antitrombótico, anti-inflamatório e antiangiogênico de extratos de frutas e plantas ricas em ácido elágico e elagitaninos, principalmente devido a esse efeito antioxidante (LARROSA et al., 2010). Como exemplo prático, o ácido elágico pode ser utilizado na produção de sucos ricos em antocianinas, com o objetivo de aumentar a estabilidade das mesmas e, consequentemente, preservar a coloração do produto (ROIDOUNG et al., 2016).

A quercetina-3-*O*-rutinosídeo é um flavonol, abundantemente encontrado em plantas, como o maracujá, a jabuticaba, o trigo sarraceno, o chá e a maçã. Quimicamente, é uma molécula composta por um núcleo flavânico constituída de dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano heterocíclico C (quercetina) acoplado ao dissacarídeo rutinose. Tal molécula tem demonstrado uma série de atividades farmacológicas, incluindo antioxidante, citoprotetora, vasoprotetora e anticancerígena (GANESHPURKAR et al., 2017).

O ácido ferúlico (**Figura 4**) é um derivado de ácido cafeico amplamente encontrado em vegetais, cereais e algumas bebidas, como café e cerveja. Pode ser encontrado livre, dimerizado ou esterificado com polissacarídeos e proteínas nas células vegetais. Porém, se apresenta amplamente sob a forma insolúvel, apesar das evidências sugerirem que sua ação biológica protetora dependa de sua forma solúvel (ADOM & LIU 2002; WANG et al., 2013). Este composto é antioxidante devido à capacidade de

eliminar os radicais livres e ativar a resposta ao estresse celular, além de já ser conhecido por suas funções coleréticas (aumenta as atividades biliares digestivas), hipolipidêmicas e diuréticas (MANCUSO et al., 2014).

A farinha de trigo integral e os farelos de cereais contêm quantidades significativas de ácido ferúlico e de seus produtos acoplados oxidativamente (chamados ácidos diferúlicos ou desidrodímeros de ácido ferúlico) (BOZ, 2015). O grão de trigo contém aproximadamente de 0,8 g a 2,0 g de ácido ferúlico por quilo em matéria seca, e isso corresponde a 90% dos polifenóis totais do trigo. Por este motivo, é relatado que o ácido ferúlico é usado como marcador da capacidade antioxidantes deste cereal (GANI et al., 2012). Afirma-se que os ácidos hidroxicinâmicos, no cólon, podem sofrer ação das bactérias ali presentes e se tornarem solúveis. Ainda na região colônica, as bactérias continuam agindo ao utilizar parte da cadeia carbônica estrutural destes compostos, como o ácido ferúlico, como fonte energética, transformado-os em outros compostos de menor cadeia. Estes novos compostos podem ser absorvidos e possuem papel importante na proteção do organismo humano contra o câncer de cólon por meio de efeito antimutagênico (BOZ, 2015).

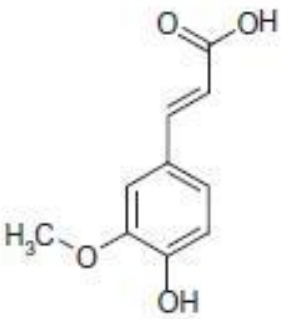

Figura 4. A estrutura química do ácido ferúlico (Adaptado de MANCUSO et al., 2014).

A estabilidade da farinha de trigo integral é afetada pela composição lipídica e a presença de diferentes antioxidantes. O teor de lipídios da farinha de trigo integral está na faixa de 1,3% a 2,0%, dependendo do tipo de trigo e do método de moagem. O principal ácido graxo encontrado no trigo é o ácido linoléico (C18:2), que constitui de 52% a 57% da composição de ácidos graxos (PRABHASANKAR & RAO, 2001).

Juntamente a isso, o pão integral normalmente é preparado com a adição de óleo de soja, que aumenta especialmente o teor do ácido graxo linoléico. A oxidação de

ácidos graxos insaturados produz uma mistura complexa de substâncias voláteis que afeta as propriedades sensoriais dos alimentos, o que pode gerar rancificação, acidificação, amargor, entre outros efeitos, ocorridos durante a estocagem. Tocoferóis (lipossolúveis) e ácidos fenólicos (solúveis) são responsáveis pela maior parte da capacidade antioxidante no trigo (JENSEN et al., 2011).

Além disso, as melanoidinas, formadas durante a cocção como consequência da reação de Maillard também são conhecidas por possuírem atividade antioxidante. Tais compostos podem afetar positivamente a estabilidade oxidativa global dos produtos coccionados (MICHALSKA et al., 2008). Segundo JENSEN et al. (2011), a capacidade antioxidante do pão integral pode ser reduzida durante o armazenamento havendo acúmulo de hidroperóxidos lipídicos, em especialapós 2 a 3 semanas de armazenamento.

Outro fator que influencia a estabilidade dos produtos de panificação é a retrogradação do amido que ocorre após o resfriamento do pão. A estrutura cristalina do amido durante o armazenamento recupera-se lentamente. A retrogradação é tecnologicamente importante porque produz mudanças significativas em propriedades como a elasticidade, a suavidade e a umidade, que são importantes na percepção sensorial do pão. A velocidade desse processo depende da formulação usada e das condições de armazenamento, principalmente temperatura e umidade. Durante o armazenamento, a migração de água do miolo para a crosta ocorre, o que leva a uma diminuição da concentração e atividade da água do miolo e amaciamento da crosta. No entanto, a migração de água não é o principal motivo para o envelhecimento do pão. Supõe-se que o envelhecimento é causado principalmente pela retrogradação da amilopectina (**Figura 5**). No amido, a fração não ramificada de cadeia curta das moléculas de amilopectina são organizadas como pequenos cristais formados a partir de duplas hélices. As moléculas lineares de amilase estão aparentemente presentes em um estado amorfo no grânulo de amido e conforme os cristais de amido vão se desfazendo após a cocção, essa enzima entra se ativa, acelerando o processo de envelhecimento do pão (MIHHALEVSKI et al., 2012).

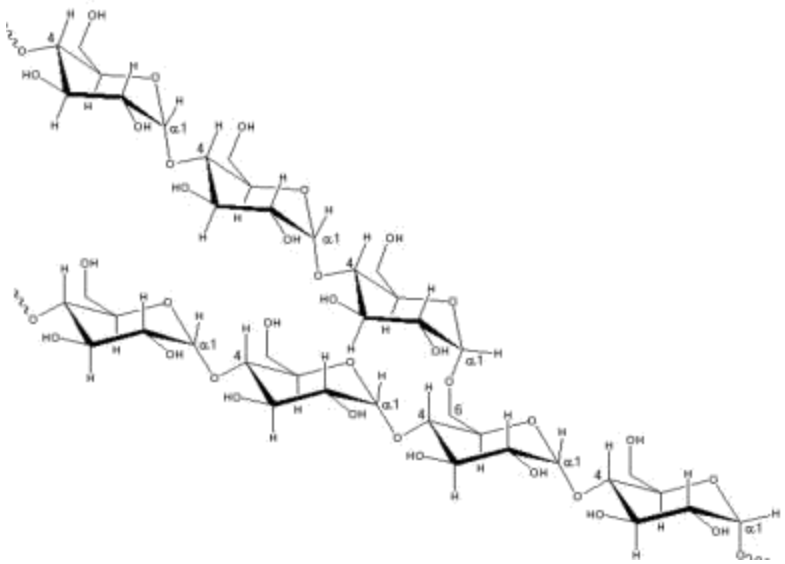

Figura 5. Estrutura da amilopectina [polímero ramificado composto por D-glicoses unidas em α-(1-4) e α-(1-6)].

Além dos compostos fenólicos explicitados anteriormente, existem os taninos hidrolisáveis (poliésteres adicionados de uma porção de açúcar e ácidos orgânicos), os galotaninos e os elagitaninos, que por si só possuem alta capacidade antioxidante, e têm como seus derivados, o ácido gálico e elágico, respectivamente, os quais são amplamente encontrados na jabuticaba (PLAZA et al., 2016).

2.1 Antocianinas

Outros compostos que estão em grande quantidade na jabuticaba, principalmente na casca, são as antocianinas. Estas pentencem a um subgrupo de flavonoides solúveis em água e são responsáveis por muitas das cores observadas na natureza, em especial as arroxeadas. Uma diversidade de alimentos são é fonte de antocianinas e incluem frutas tipo *berries*, uvas, ameixas e cerejas, bem como grãos e legumes, tais quais arroz preto, cenouras pretas, batatas doces e couves vermelhas (SUI et al., 2015). Normalmente, são encontrados na natureza nas formas glicosiladas e aciladas (ZHANG et al., 2014) (**Figura 6**).

Antocianinas provenientes de extratos de plantas foram analisadas em estudos *in vitro* e apresentaram redução do estresse oxidativo, prevenção de algumas doenças inflamatórias, prevenção de doenças cardíacas, proteção contra obesidade e hipoglicemia, melhoria da memória e proteção do tecido cerebral fetal (BRITO et al., 2007; DAI et al., 2009). A diabetes tipo 2 é uma doença que pode ser caracterizada pela

resistência à insulina e disfunção de células beta pancreáticas, e leva a complicações macro e microvasculares. De acordo com alguns estudos, as antocianinas podem prevenir o diabetes tipo 2 e a obesidade (SANTOS & MEIRELES, 2009; SANCHO & PASTORE, 2012).

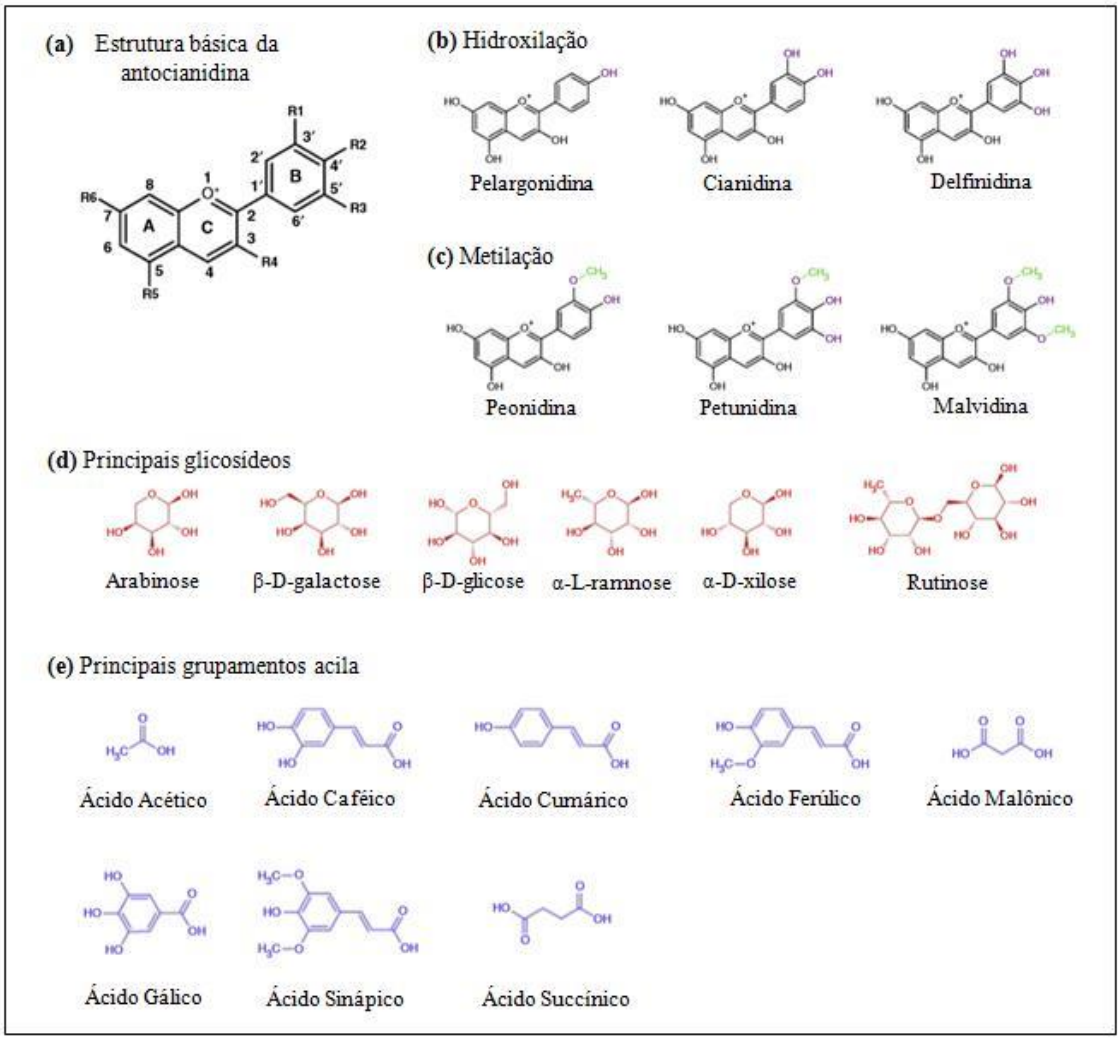

Figura 6. Estrutura básica das principais antocianidinas e grupamentos para formação das diferentes antocianinas encontradas na natureza (Adaptado de ZHANG et al., 2014)

A cianidina-3-*O*-glicosídeo é uma das principais antocianinas encontradas nas frutas de cores avermelhas e/ou arroxeadas. Vários estudos relataram os efeitos benéficos da cianidina-3-*O*-glicosídeo contra condições de hipóxia em células endoteliais (ANWAR et al., 2014), antitumorais (DING et al., 2006), supressão da obesidade e atividade contra a disfunção endotelial e vascular (SASAKI et al., 2007). A cianidina-3-*O*-glicosídeo exerce efeitos vantajosos por meio dos efeitos antioxidante e

anti-inflamatório exercidos em moléculas biológicas importantes envolvidas em vários eventos celulares (SERRAINO et al., 2003).

A delfinidina-3-*O*-glicosídeo é um composto bioativo encontrado em mirtilos e outras frutas e flores. Alguns estudos já mostraram que a delfinidina-3-*O*-glicosídeo apresenta efeitos benéficos contra a oxidação das lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDL), o que caracteriza sua capacidade antitrombótica (YANG et al., 2012).

O ácido protocatecuico e o ácido gálico fazem parte da estrutura da cianidina e delfinidina, respectivamente (SINELA et al., 2017), e estas antocianinas básicas quando glicosiladas por um açúcar, formam a cianidina-3-*O*-glicosídeo e a delfinidina-3-*O*-glicosídeo, que são as duas principais antocianinas encontradas na jabuticaba.

A estabilidade das antocianinas é afetada por fatores, como pH, temperatura, exposição à luz e oxigênio, solventes e presença de enzimas, flavonoides, proteínas e íons metálicos (BAKOWSKA et al., 2003). Em valores de pH maiores que 7,0, as antocianinas podem degradar-se e em pH 1,0, o cátion flavílio é predominante, o que contribui para a coloração roxa e vermelha (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

As formas agliconas das antocianinas apresentam baixa estabilidade e por isso, normalmente elas encontram-se glicosiladas e/ou aciladas. Geralmente, a glicosilação das antocianidinas ocorre na posição 3 do anel C, sendo os açúcares mais comuns a glicose, ramnose, galactose, arabinose ou xilose. Glicosilações adicionais fornecem mais resíduos de açúcar para acilação das antocianinas com ácidos aromáticos (*p*-coumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, gálico ou *p*-hidroxibenzóico) ou ácidos alifáticos (malônico, acético, málico, succínico, tartárico e oxálico), que afetam a coloração e aumentam a estabilidade destes pigmentos (ZHANG et al., 2014). As antocianinas são muito reativas em relação aos metais e podem ser oxidadas pelo cobre e pelo ferro (SINELA et al., 2017).

Sabe-se também que quando a antocianina está presente na matriz do alimento ela tende a se manter mais estável do que quando isolada ou em um extrato. Nas soluções aquosas de grau alimentar, o aumento da força iônica levará à formação de pares de íons pelas antocianinas, que contribuem significativamente para sua estabilização. Uma possível explicação para isso é: (a) uma interação eletrostática entre o ânion e o cátion de flavílio carregado, deslocando o equilíbrio, o que implica uma menor taxa de formação de chalconas; (b) uma hidratação preferível do ânion, protegendo assim a molécula de antocianina contra o ataque nucleofílico da água (SINELA et al., 2017). Outro fator que também influencia na estabilidade das

antocianinas é o tipo de resíduo de açúcar ou ácido fenólico que está ligado em sua estrutura (SINELA et al., 2017).

Além disso, já foi visto na literatura que a temperatura influencia nos teores de antocianinas. No trabalho de GÓRNÁS et al. (2016) foi observada a redução das antocianinas provenientes de frutas vermelhas que foram adicionadas em muffins durante a cocção dos mesmos tanto em forno convencional quanto em outros métodos de cocção. A sensibilidade das antocianinas a temperatura é alta, visto que temperaturas relativamente baixas, como 55 ºC já demonstram afetar o teor desses compostos nos produtos de panificação, afetando, percentualmente, mais a delfinidina do que a cianidina (SINELA et al., 2017).

Ao contrário das antocianinas, muitos compostos fenólicos possuem agliconas liberadas da clivagem de glicosídeos ou ésteres mais complexos durante o processamento, como a cocção. Uma vez que o conteúdo nativo de agliconas geralmente é baixo nos alimentos, podem ocorrer diferentes fatores de retenção, tornando difíceis de estabelecer regras gerais. Além disso, alguns fenólicos também podem estar ligados a componentes não digeríveis da matriz alimentar e a interrupção da estrutura celular pelo processamento pode causar a sua liberação e solubilização. Ácido ferúlico, por exemplo, é encontrado covalentemente ligado a fibra do trigo (ROTHWELL et al., 2015).

3. Jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba)*

3.1 Aspectos botânicos, consumo e comercialização

A árvore da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* ou *jaboticaba* (Mart.) O. Berg.) pertence à família *Myrtaceae* e é nativa do Brasil. Os frutos da jabuticabeira crescem rapidamente dentro de 40 a 46 dias, e, quando maduro, é arredondado, com cerca de 2 cm de diâmetro, e apresentam casca de coloração que varia de roxo avermelhado a preto, com polpa doce e esbranquiçada (WU et al., 2012) (**Figura 7**). É encontrada em grande parte do Brasil, porém o maior volume de produção ocorre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. A principal espécie é a *Myrciaria jaboticaba* ou jaboticaba sabará, mas existem outras, como a *Myrciaria cauliflora* (ASCHERI et al., 2006; PLAZA et al., 2016).

Figura 7. Fruto da jabuticabeira (jabuticaba madura).

A jabuticaba é geralmente consumida na forma fresca, ou ainda na forma de sucos, geleias, vinhos e licores (WU et al., 2012). Porém, o período de comercialização da fruta é curto. Após a colheita, a fruta deve ser é consumida em até três dias devido a uma intensa perda de água, deterioração e fermentação da polpa. Então, mesmo que a jabuticaba possua alta produtividade e características sensoriais desejáveis, sua alta perecibilidade prejudica a sua comercialização (AGOSTINI et al., 2009). Para manter a qualidade da jabuticaba, recomenda-se refrigeração (13 °C a 15 °C) imediatamente após a colheita (CANTWELL, 2001).

3.2 Caracterização química

A jabuticaba tem importância nutricional por apresentar altos teores de fibra alimentar, vitaminas e minerais, em especial ferro, cobre e vitamina C (INADA et al., 2015). De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006), uma porção de 100 g de jabuticaba contém 58 kcal e 2,3 g de fibra. Além disso, as espécies de jabuticaba são reconhecidas por possuir em altos teores de compostos fenólicos (INADA et al., 2015; PLAZA et al., 2016; WU et al., 2013).

Os principais compostos fenólicos não antocianinas encontrados na jabuticaba são os ácidos gálico, elágico, *trans*-cinâmico, *m*-cumárico e 3,4-dihidroxibenzóico e quercetina, miricetina, quercetina-3-*O*-rutinosídeo e miricetina-3-*O*-ramnosídeo. As principais antocianinas encontradas na jabuticaba são a delfinidina-3-*O*-glicosídeo e a cianidina-3-*O*-glicosídeo (INADA et al., 2015). Uma variedade de outros compostos já foi identificada, tais como outras antocianinas, flavonóis, galotaninos, elagitaninos,

dentre outros (ALEZANDRO et al., 2013; PLAZA et al., 2016; WU et al., 2013). O composto encontrado em maior concentração na jabuticaba é a cianidina-3-*O*-glicosídeo, seguida dos galotaninos e elagitaninos e seu ácidos derivados (ácido gálico e elágico, respectivamente) (INADA et al., 2015; REYNERTSON et al., 2008; WU et al., 2012).

Na casca e na semente da jabuticaba foram encontrados teores superiores de fibras, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais em relação a polpa (GURAK et al., 2014; INADA et al., 2015; LENQUISTE et al., 2015). GURAK et al. (2014) prepararam diferentes farinhas provenientes da jabuticaba e observaram que a farinha preparada a partir do resíduo do fruto possui 61% a mais de compostos fenólicos totais e 58% a mais de antocianinas totais do que a farinha preparada com a fruta inteira. INADA et al. (2015) observaram que o subproduto da jabuticaba possui em sua fração solúvel teores de ácido gálico e ácido elágico superiores em 80% e 66%, respectivamente, quando comparados com a fruta inteira. O mesmo padrão se seguiu para as antocianinas delfinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo, que obtiveram teores superiores em 69% e 60% no resíduo, respectivamente.

3.3 Potenciais efeitos benéficos à saúde

Frutas de cor escura, como a jabuticaba, são muito populares em muitas culturas, e *in vitro* e *in vivo* demonstram que eles são benéficos para a saúde humana (WU et al., 2012). Semelhante a outras frutas escuras como a mirtilo, uvas, amora, cereja e outras, a jabuticaba é rica em constituintes fenólicos, incluindo antocianinas, flavonoides e elagitaninos. Esses compostos possuem propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante e anti-inflamatória (WU et al., 2012). Na medicina popular, a jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) é descrita como adstringente, útil contra a diarreia, protege a pele contra irritações dérmicas, defende o trato digestório contra inflamações intestinais, impede a elevação dos níveis da lipoproteína de alta densidade (LDL) e na melhora da resistência à insulina (HSU et al., 2016).

A atividade anti-inflamatória da jabuticaba também a torna um alimento funcional emergente e promissor para fumantes, uma vez que diminui o impacto do dano pulmonar devido à exposição ao fumo do cigarro. As antocianinas da jabuticaba exibem boa atividade contra a citotoxicidade do cigarro, além de inibir a produção de IL-8, tanto nas células epiteliais que são tratadas com extrato de fumo de cigarro pró-

inflamatório, quanto nas células das pequenas vias aéreas não tratadas (REYNERTSON et al., 2006).

Também já foi reportado na literatura o efeito antidiabético, bem como proteção contra danos hepáticos e degradação de colágeno, principalmente devido ao perfil de compostos fenólicos presentes na jabuticaba (PEREIRA et al., 2017). As antocianinas presentes na casca da jabuticaba já demonstraram potenciais benefícios no tratamento da obesidade e da resistência à insulina, em animais experimentais (ALEZANDRO et al., 2010). Os elagitaninos isolados da jabuticaba indicaram que esse fruto pode também apresentar atividade inibidora de α-glicosidase (WU et al., 2013).

Segundo WU et al. (2013), a jaboticabina (um dos principais compostos fenólicos da jabuticaba) tem efeitos citotóxicos moderados em linhagens celulares de câncer de cólon HCT-116 e HT-29. A delfinidina-3-*O*-glicosídeo também mostrou forte citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer de cólon (HCT116 e SW480). Já a cianidina-3-*O*-glicosídeo mostrou apenas uma ligeira citotoxicidade para essas mesmas linhagens celulares (REYNERTSON et al., 2006). LEITE-LEGATTI et al. (2012) também avaliaram os efeitos antiproliferativos do extrato metanólico da casca de jabuticaba em 11 diferentes linhagens de células tumorais, tais como glioma (U251), melanoma (UACC-62), câncer de mama (MCF7), câncer de ovário (NCI-ADR/RES), câncer de cólon (HT29), leucemia (K-562), entre outras. Tal extrato apresentou maior atividade antiproliferativa na linhagem celular de leucemia (K-562), e o seu extrato insolúvel apresentou maior atividade contra uma linhagem celular de câncer de próstata (PC-3).

É possível observar com todos os trabalhos citados anteriormente que os compostos encontrados na jabuticaba possuem potencial efeito benéfico à saúde. Porém, quase todos os trabalhos desenvolvidos até o momento foram realizados em modelo *in vitro*, sendo necessário o desenvolvimento de ensaios clínicos, bem conduzidos, que demonstrem efetivamente a bioatividade desses compostos bioativos presentes tanto na jabuticaba como em seus produtos.

4. Bioprocessamento

O bioprocessamento de alimentos é caracterizado pela transformação de matérias-primas alimentares, através da utilização de células vivas ou componentes de sua maquinaria bioquímica, podendo ser um processo fermentativo ou enzimático.

Atualmente, sabe-se que o bioprocessamento promove modificações estruturais na matriz alimentar e, portanto, pode ser empregado pela indústria de alimentos com o intuito de facilitar e/ou aumentar a liberação dos compostos fenólicos insolúveis das estruturas celulares e melhorar as características sensoriais dos produtos (WANG et al., 2014).

Um exemplo de bioprocessamento que já é amplamente utilizado na indústria alimentícia é a fermentação *sourdough*, pois melhora textura, volume e vida de prateleira (KTENIOUDAKI et al., 2015). Outro tipo de bioprocessamento também utilizado é o enzimático. As principais enzimas utilizadas são a xilanase, β-glucanase, acido ferúlico esterase, fitase, alfa-amilase e celulase, devido as propriedades geradas aos produtos finais de panificação. Os principais efeitos decorrentes do uso das enzimas incluem o aumento da acessibilidade aos compostos fenólicos, solubilização dos AX, aumento do volume, melhora da textura da casca e do produto no geral, melhora da digestibilidade proteica e aumento da biodisponibilidade dos minerais (ABDEL-AAL & RABALSKI 2013; CODA et al., 2015; DZIKI et al., 2014; KTENIOUDAKI and GALLAGHER, 2012).

As enzimas agem na estrutura dos cereais, como o trigo, alterando mais especificamente a estrutura das camadas externas (quando estas estão presentes, como na farinha de trigo integral), que são ricas em fibras (polissacarídeos) e consistem basicamente em celulose, lignina e arabinoxilano (AX), em sua maioria, insolúveis. Mas, também podem agir nas paredes celulares do aleurona (camada que reveste o endosperma do grão, como pode ser visto na (**Figura 8**), que consiste principalmente de AX solúveis e beta-glucano (COURTIN & DELCOUR, 2002; FREDERIX et al., 2004; GOESAERT et al., 2005; MESSIA et al., 2016; NORDLOUND et al., 2013).

Os AX insolúveis representam 70% a 85% da composição das paredes celulares do endosperma. Demonstrou-se que, na ausência de endoxilanases adicionadas, apenas 10% a 15% dos AX insolúveis são solubilizados durante a fase de mistura da massa (AUTIO, 2006). Os AX insolúveis podem perturbar a formação de glúten. Durante a fermentação, eles podem formar intrusões nas paredes celulares que cercam as células retentoras dos gases produzidos durante a fermentação (AUTIO, 2006). COURTIN *et al*. (2001) mostraram que endoxilanases tem uma forte seletividade para hidrólise de AX insolúveis e que a conversão destes em AX solubilizados é benéfica para rendimento de glúten e qualidade de cozimento.

O teor total de arabinoxilano na farinha de trigo é em média de 2,1% e o teor de arabinoxilanos solúveis em água varia de 0,3% a 0,7%. (AUTIO, 2006). Os AX influenciam na qualidade da panificação, incluindo volume, textura e densidade, principalmente se sofrerem ação de enzimas hidrolíticas, como a xilanase, que hidrolisam os AX insolúveis, gerando clivagem nas células da parede do grão, permitindo que mais água seja absorvida entre a estrutura da matriz, durante a cocção (CODA et al., 2015; COURTIN & DELCOUR, 2002; MIHHALEVSKI et al., 2012). Na realidade, a xilanase quebra a xilana em xilose (açúcar) e cessa sua atividade ao alcançar a cadeia de arabinose. Nos AX insolúveis, a xilanase diminui o grau das ligações moleculares, permitindo que a parede celular absorva mais água, ao mesmo tempo que fragmentos dos AX se solubilizam e aumentam a viscosidade para manter essa água na massa (COURTIN & DELCOUR, 2002).

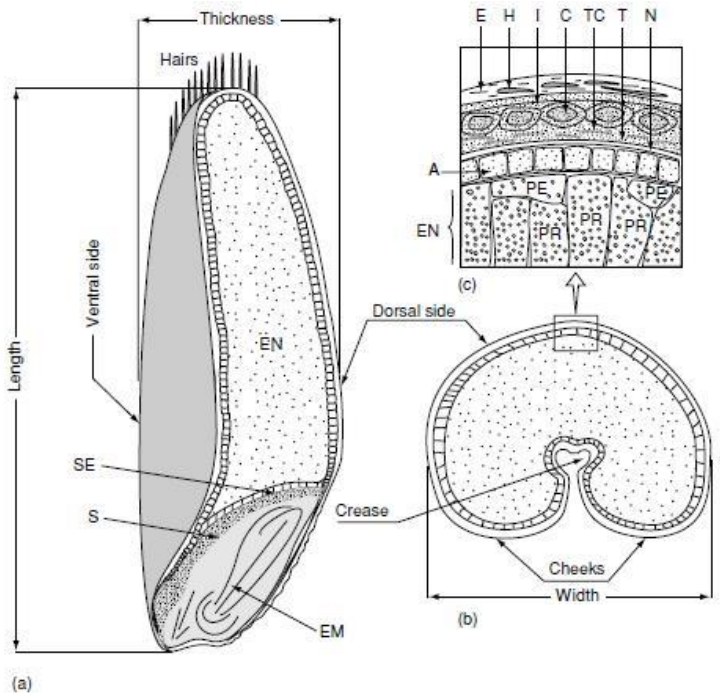

Figura 8. Principais componentes morfológicos de uma semente de trigo. (a) seção longitudinal; (b) seção transversal; (c) segmento da camada de farelo com células de aleurona e endosperma. E, epiderme; H, hipoderme; I, pericarpo interno; C, células cruzadas; TC, células de tubo; T, testa; N, nucelar camada; A, camada de aleurona; EN, endosperma; PE, células periféricas do endosperma; PR, células prismáticas do endosperma; SE, epitélio escutelar; S, escutelo ; EM, embrião. (GRUNDAS, 2003)

As enzimas endo-β-1,4-xilanase são principalmente responsáveis pela clivagem das ligações β-1,4 entre os resíduos de xilose (componente dos xilanos), principal integrante da hemicelulose. As xilanases também têm várias aplicações na indústria de

alimentos (processamento de frutas e vegetais, fabricação de cerveja, produção de vinho, cocção, entre outros), bem como em outros setores técnicos (produção de polpa, papel, têxteis, biorremediação/bioconversão). Essas enzimas também podem ser usadas como suplemento nutricional na alimentação animal (AMORIM et al., 2017). Nos produtos de panificação, a adição de endoxilanases é benéfica para as propriedades da massa e a qualidade do pão (CODA et al., 2015).

As xilanases fornecem, portanto, uma das atividades enzimáticas mais importantes necessárias para a despolimerização do constituinte hemicelulósico das paredes celulares das plantas (BRAGA et al., 2014). Entretanto, um extrato enzimático nem sempre possui apenas uma atividade enzimática. A xilanase é um complexo de enzimas com múltiplas ações, incluindo a feruloil-esterase. Esta é responsável pela remoção de cadeias laterais de ácido ferúlico eliminando as ligações entre os polissacarídeos e as estruturas de lignina (BRAGA et al., 2014).

Vale ressaltar que, na farinha de trigo integral, os compostos fenólicos estão presentes principalmente nas formas insolúveis, associados a componentes da parede celular (ADOM et al., 2003; OKARTER et al., 2010; DINELLI et al., 2011; HUNG et al., 2011), o que prejudica sua bioutilização, uma vez que, para promover os efeitos benéficos à saúde, os compostos fenólicos devem estar solúveis e disponíveis para absorção no organismo humano (PODSEDEK et al., 2014; WANG et al., 2014). Foi relatado que o bioprocessamento enzimático dos cereais afeta positivamente o teor de compostos fenólicos solúveis e, possivelmente, suas propriedades bioativas e benéficas para a saúde (ABDEL-AAL et al., 2013). Portanto, é necessário que estes compostos passem de sua forma insolúvel para sua forma solúvel, de forma que possam se tornar mais biodisponíveis no organismo humano.

Em particular, o ácido ferúlico parece estar principalmente ligado por ligações ésteres a heteroxilanos, principais componentes de fibras alimentares do farelo, sendo assim a maior parte não está disponível para absorção no trato gastrointestinal. De fato, os ácidos fenólicos livres compõem menos de 4% dos fenólicos totais em grãos. O bioprocessamento das farinhas e farelos provoca a degradação parcial das paredes das células liberando compostos fenólicos da fibra presente na matriz do farelo, melhorando assim a sua biodisponibilidade (KOISTINEN et al., 2016).

JUSTIFICATIVA

O pão é um dos produtos mais consumidos no Brasil e no mundo devido ao seu baixo custo e densidade energética. Quando preparado com farinha integral, este produto se torna mais rico em fibras, vitaminas, minerais e fitoquímicos, quando comparado à versão com farinha refinada. Frutas em geral são as principais fontes de compostos bioativos na dieta, podendo ser incorporadas em produtos de panificação como estratégia para melhorar as características bioativas destes. No entanto, a substituição parcial da farinha de trigo por farinha de frutas pode trazer aspectos tecnológicos e sensoriais negativos que podem ser minimizados pela aplicação do bioprocessamento. Juntamente a isso, a utilização do bioprocessamento enzimático de alimentos como meio tecnológico pode aumentar os teores de compostos fenólicos solúveis no pão integral adicionado de farinha de fruta, melhorando suas propriedades bioativas. Portanto, no presente trabalho foi elaborada uma farinha proveniente do subproduto da jabuticaba, casca e semente, a fim de incorporá-la em pães integrais, sendo assim uma alternativa para redução do desperdício e enriquecimento destes produtos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito do bioprocessamento enzimático sobre as características tecnológicas e sobre os teores de compostos fenólicos em pães adicionados de farinha de jabuticaba.

Objetivos específicos

a) Obter a farinha do subproduto da jabuticaba e avaliar sua capacidade antioxidante e os teores de compostos fenólicos;
b) Investigar a estabilidade da farinha do subproduto da jabuticaba em relação à capacidade antioxidante e compostos fenólicos ao longo de 90 dias de armazenamento, em temperatura ambiente sob abrigo da luz;
c) Verificar o efeito da adição da farinha de jabuticaba em pães sobre a composição centesimal, capacidade antioxidante, teor de compostos fenólicos, qualidade microbiológica e aceitação sensorial de pães tipo forma integral;
d) Avaliar o efeito da panificação/cocção sobre a capacidade antioxidante, teores de compostos fenólicos dos pães tipo forma integral adicionados ou não da farinha de jabuticaba;
e) Analisar o impacto do bioprocessamento sobre a capacidade antioxidante, teor de compostos fenólicos, qualidade microbiológica e aceitação sensorial de pães tipo forma integral adicionados ou não da farinha de jabuticaba.

CAPITULO 1

PÃES INTEGRAIS ENRIQUECIDOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS POR MEIO DA ADIÇÃO DE FARINHA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA)*

Resumo

O pão é um dos alimentos mais consumidos no mundo. Atualmente, a adição de diferentes tipos de farinhas de frutas na formulação dos pães tem se tornado uma prática comum na indústria de alimentos. A jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*) apesar de rica em compostos fenólicos apresenta alta perecebilidade e geração de subprodutos (cascas e sementes) durante seu processamento. Logo, a elaboração de uma farinha de jabuticaba (FJ) na substituição da farinha de trigo se torna relevante. O objetivo deste trabalho foi elaborar um pão de forma integral enriquecido com farinha de jabuticaba. Parâmetros físico-químicos, composição centesimal, capacidade antioxidante (CA) e teores de compostos fenólicos (CF) foram avaliados na FJ e nos pães (pão elaborado com 100% de farinha de trigo integral – PI e pão elaborado com substituição de 10% da farinha de trigo integral pela FJ – PJ). Ao longo de 90 dias de armazenamento, a CA e os teores de CF da FJ reduziram 81% e 47%, respectivamente. Também foi observada redução dos tons vermelhos da FJ durante o armazenamento. A adição da FJ resultou em pães com maior teor de resíduo mineral fixo e maior CA quando comparado ao PI. A quantidade de CF também foi aproximadamente três vezes maior no PJ comparado ao PI. O processo de panificação/cocção promoveu o aumento do teor de CF solúveis no PJ. O presente trabalho demonstrou que a adição de FJ enriquece o pão com nutrientes e compostos bioativos, o que sugere a criação de um alimento que pode trazer benefícios à saúde.

1. Introdução

Os produtos de panificação são consumidos diariamente em grande quantidade pela população mundial, constituindo uma das principais fontes energéticas da dieta (KTENIOUDAKI and GALLAGHER, 2012). Estes produtos podem ser apresentados na forma de pães, biscoitos, massas, entre outros (UCHOA et al., 2009). Quando se utiliza a farinha de trigo integral, os pães podem ser considerados importantes fontes

dietéticas de fibra alimentar, vitaminas e micronutrientes, sendo, portanto, de boa qualidade nutricional (DEWETTINCK et al., 2008). Adicionalmente, também apresentam em sua composição os compostos fenólicos, em especial o ácido ferúlico, provenientes do trigo (ABDEL-AAL & RABALSKI 2013; HEMERY et al., 2010).

Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas aos compostos fenólicos, tais como atividade antialérgica, anti-aterosclerótica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, anticancerígena e cardioprotetora (ABAZA et al., 2015; SHAHIDI et al., 2015; WU et al., 2012). A possibilidade de obter estes componentes a partir de matrizes naturais é interessante, principalmente se estas forem provenientes de subprodutos da indústria de alimentos, normalmente descartados, contribuindo para solucionar questões econômicas e estimulando a sustentabilidade (STORCK et al., 2015).

Sabe-se que o processamento térmico, como o forneamento do pão, pode provocar alterações na composição química desse alimento, dentre eles, o aumento nos teores do ácido ferúlico (ABDEL-AAL & RABALSKI 2013; LIU, 2007; MOORE et al., 2009). Outro fator que influencia os teores dos compostos fenólicos dos produtos de panificação é a ação do fermento biológico utilizado na preparação, que, geralmente é constituído da levedura *Saccharomyces cerevisiae.* De fato, as interações entre microrganismos e o ambiente em que estão alocadas podem gerar uma transformação importante na composição dos ingredientes da massa cujos efeitos podem conferir propriedades funcionais ao produto (KATINA et al., 2007a). Além da melhora de qualidade sensorial (aroma, textura, sabor e cor), a fermentação age ocasionando a polimerização e solubilização dos compostos fenólicos, o que pode aumentar sua biodisponibilidade (SAA et al., 2017).

A jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) é uma fruta nativa da mata atlântica, muito apreciada do ponto de vista sensorial e de importância nutricional por apresentar altos teores de fibras alimentares, vitaminas e minerais, em especial ferro, cobre e vitamina C (INADA et al., 2015). Ela é encontrada de forma espontânea em grande parte do Brasil, porém a maior produtividade se dá nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. É uma planta que produz frutos globulares com uma casca de coloração púrpura e polpa doce e esbranquiçada. Várias espécies são encontradas, sendo a *Myrciaria jaboticaba* a principal. Além dos constituintes nutricionais, a jabuticaba se destaca por possuir altos teores de compostos fenólicos, dentre eles: os ácidos gálico, elágico, 3,4-dihidroxibenzóico, *trans*-cinâmico e *m*-cumárico, delfinidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-

3-*O*-glicosídeo, quercetina, miricetina, quercetina-3-*O*-rutinosídeo e miricetina-3-*O*-ramnosídeo (INADA et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; PLAZA et al., 2016; REYNERTSON et al., 2006; WU et al., 2013).

Sabe-se que os compostos fenólicos da jabuticaba apresentam importantes características antioxidantes devido as suas estruturas químicas aromáticas dotadas de átomos de oxigênio que atuam como receptores de elétrons, agindo contra os radicais livres, além de possuírem outras propriedades benéficas a saúde (GANESHPURKAR et al., 2017; LARROSA et al., 2010; ROIDOUNG et al., 2016; SEPULVEDA et al., 2011; VERMA et al., 2013). As antocianinas presentes na jabuticaba também apresentam propriedades biológicas, tais como antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (ANWAR et al., 2014; DING et al., 2006; SASAKI et al., 2007), com enfoque para as propriedades antitrombóticas e contra a disfunção endotelial e vascular (ANWAR et al., 2014; SERRAINO et al., 2003; YANG et al., 2012).

Atualmente, muitas frutas são caracterizadas por possuírem elevados teores de compostos fenólicos. Em relação a *Myrciaria jaboticaba*, apesar de seu elevado potencial bioativo, a fruta é muito perecível, o que prejudica sua comercialização (ASCHERI et al., 2006; CITADIN et al., 2010). Entretanto, as cascas e sementes da jabuticaba possuem compostos fenólicos que são benéficos à saúde e que estão sendo atualmente, pouco aproveitadas na indústria. A elaboração de uma farinha com esses subprodutos e sua incorporação em produtos de panificação pode ser uma alternativa para redução do desperdício e enriquecimento da dieta. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma farinha de jabuticaba proveniente dos subprodutos do fruto e avaliar sua estabilidade química. Adicionalmente, objetivou-se avaliar o efeito da adição desta farinha em pães integrais sobre os teores de compostos fenólicos, atividade antioxidante, composição centesimal, qualidade sensorial e microbiológica destes produtos bem como o efeito da panificação sobre os teores dos compostos fenólicos.

2. Material e métodos

2.1. Material, solventes, reagentes e padrões

Fluoresceína, 2,4,6-Tris(2-piridil)-S-triazina (TPTZ), ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox), reagente de *Folin & Ciocalteu*, e

cloreto férrico foram adquiridos da *Sigma-Aldrich Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA). Sulfato de ferro (II) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os solventes foram grau CLAE e adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA). Água grau CLAE (sistema Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) foi utilizada em todos os experimentos. Os padrões comerciais de antocianinas e não antocianinas foram adquiridos, respectivamente, da *Indofine Chemical Co.* (Hillsborough, NJ, EUA) e *Sigma-Aldrich Chemical Co.* Filtro de seringa de PTFE hidrófilo (13 mm x 0,45 μm) foi adquirido da Analítica (São Paulo, SP, Brasil).

2.2. Elaboração da farinha de jabuticaba e dos pães

As jabuticabas foram adquiridas na CADEG (Mercado Municipal do Rio de Janeiro), sanitizadas e armazenadas a -20 °C até o momento da elaboração da farinha. O subproduto da jabuticaba, que consiste nas cascas e sementes, foi obtido após despolpamento para obtenção de suco de jabuticaba. O subproduto foi embalado à vácuo e armazenado a -20 °C até o momento da elaboração da farinha da jabuticaba (FJ). A FJ foi obtida após desidratação em estufa com circulação forçada de ar (55 °C por 14 h). A combinação de tempo e temperatura de estufa foi determinada a partir de uma pesquisa prévia feita pelo nosso grupo de pesquisa. Após a secagem, a amostra foi moída (A11, IKA® Werke, Staufen, Alemanha) e armazenada em sacos plásticos estéreis a vácuo e acondicionadas à temperatura ambiente sob abrigo de luz por 90 dias.

O pão integral (PI) foi preparado de acordo com Castelo-Branco et al. (2016) com modificações, utlizando máquina de pão automática (BK2000B, Breadman, Middleton, WI) nas condições pré-estabelecidas pelo fabricante. Os ingredientes foram adicionados na seguinte ordem: 245 mL de água, 8 g de açúcar mascavo, 3 g de sal de cozinha, 15 mL de azeite extra virgem, 270 g de farinha de trigo integral, 30 g de farelo de trigo e 3 g de fermento seco (*Saccharomyces cerevisiae*). O pão de jabuticaba (PJ) foi preparado de forma semelhante ao PI, mas substituindo parcialmente a farinha de trigo integral por 10% da farinha do subproduto da jabuticaba. As massas cruas, antes de serem fermentadas, e os pães, logo após o preparo, foram arrefecidos à temperatura ambiente, cortados em pequenas fatias, moídos em um moinho de laboratório (A11, IKA® Werke, Staufen, Alemanha), selados a vácuo e armazenados a -20 °C até a análise. Os pães foram feitos em duplicata sendo preparado um *pool* destas duplicatas congeladas para todas as analises posteriores. Todos os ingredientes necessários para a

fabricação dos pães foram adquiridos em mercados locais na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

2.3. Determinação da composição centesimal

A determinação dos teores de umidade, resíduo mineral fixo, proteínas, lipídeos totais e fibras dietéticas totais (método enzimático-gravimétrico) foi realizada de acordo com os métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000). Os teores de carboidratos foram calculados pela diferença entre 100% e a soma das porcentagens de umidade, resíduo mineral fixo, proteínas, lipídeos totais e fibra alimentar. Todas as análises foram realizadas em triplicata na farinha de jabuticaba e nos pães.

O valor calórico total foi calculado com base nos teores de lipídeos, proteínas e carboidratos multiplicados pelos fatores de conversão de *Atwater* (9 kcal/g, 4 kcal/g, e 4 kcal/g, respectivamente).

2.4. Análises físico-químicas

O valor de pH da farinha de jabuticaba, dos pães e das massas cruas foi determinado conforme descrito no Manual de Métodos Físico-Químicos de Análise de Alimentos do Instituto de Adolfo Lutz (2008).

As coordenadas colorimétricas foram mensuradas nas mesmas amostras citadas anteriormente logo após o preparo das massas e dos pães em equipamento *Konica Minolta CR-400* (Konica Minolta, Tokyo, Japão). O equipamento foi calibrado com iluminante D65 (2° ângulo observador) usando uma placa branca padrão. Foram avaliados, através do CIELab, os parâmetros: L^* (brilho ou luminosidade; 0 = preto, 100 = branco), a^* ($-a^*$, verde; $+a^*$, vermelho) e b^* ($-b^*$, azul; $+b^*$, amarelo).

O volume e a densidade dos pães foram determinados de acordo com metodologia descrita pela *American Association of Cereal Chemistry* (AACC, 2001).

O rendimento foi determinado segundo a seguinte equação:

Rendimento (%) = peso final do pão / peso inicial massa crua X 100

2.5. Avaliação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada, em triplicata, na farinha de jabuticaba, nas massas cruas e nos pães, pelos métodos espectrofotométricos FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) e *Folin-Ciocalteau*). Para realização dos ensaios, cerca de 2 g das amostras foram pesadas em tubo falcon e adicionados de 10 mL de solução aquosa de metanol 40%. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 min e centrifugados por 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o resíduo foi re-extraído mais uma vez. Os sobrenadantes foram homogeneizados e o balão foi avolumado com água destilada, dando origem ao extrato que foi analisado.

2.5.1. Ferric Reduction Antioxidant Power (FRAP)

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia adaptada de BENZIE & STRAIN (1996). As soluções estoque de tampão acetato de sódio 300 mM (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10mM e cloreto de ferro 20 mM foram utilizadas para o preparo do reagente de FRAP, nas proporções de 10:1:1, respectivamente. O reagente de FRAP foi mantido à temperatura de 37 °C até o momento de sua utilização. Foram adicionados a uma microplaca de 96 poços, 20µL das diferentes concentrações do padrão e dos extratos e 180 µL da solução de FRAP em uma placa de 96 poços. A placa foi mantida a 37 °C por 6 minutos em ambiente escuro e, após esse período, a leitura foi realizada por espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Anthos Zenyth 200st microplate reader) à 593 nm. Os resultados foram expressos em µmol Fe^{+2}/100 g de farinha, em base seca. Cada extrato foi analisado em duplicata.

2.5.2. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

O ensaio de TEAC foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de RE et al. (1999). O preparo da solução estoque do radical 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) de diamônio (ABTS) foi realizado pela reação entre persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e ABTS por 12 h 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, à 720 nm, fosse de 0,70±0,02. Dez microlitros do extrato foram pipetados em

placa de 96 poços e adicionados de 190 µL da solução diluída do radical ABTS. A leitura da absorbância foi realizada à 720 nm em espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Anthos Zenyth 200st microplate reader) 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/100 g de farinha, em base seca. Cada extrato foi analisado em duplicata.

2.5.3. *Folin-Ciocalteu*

O ensaio de *Folin-Ciocalteu* foi realizado 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-Ciocalteu* e 300 µL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 20%. Após a homogeneização, a mistura foi mantida a 40 ºC por 30 minutos. A absorbância da solução foi medida à 765 nm, usando o espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Anthos Zenyth 200st microplate reader). A quantificação foi realizada pela curva padrão de ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de farinha, em base seca. Cada extrato foi analisado em duplicata.

2.6. Compostos fenólicos solúveis e insolúveis por CLAE-DAD

Extração

A extração de compostos fenólicos solúveis e insolúveis na farinha de jabuticaba e nas massas, antes da fermentação, e nos pães integral e de jabuticaba foi realizada em duplicata, conforme descrito por CASTELO-BRANCO et al. (2016), com adaptações.

A análise de compostos fenólicos solúveis, extraiu-se 1 g de cada amostra durante 5 min com 10 mL de solução etanol:água (80:20, *v*/*v*) e posterior centrifugação (2500 x *g*, 5 minutos, 10 ºC, Sorvall ST 16R, Thermo Scientific TM, Osterode, Alemanha) da mistura. O sobrenadante foi recolhido e o resíduo proveniente foi novamente extraído nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados, o solvente foi evaporado em rotaevaporador (IKA RV 10 D, Campinas, SP, Brasil) e o resíduo seco foi reconstituído em 10 mL de água e armazenado a -20 ºC até o momento da análise.

Para análise de compostos fenólicos insolúveis, o resíduo obtido após a etapa

anterior foi submetido às hidrólises alcalina e ácida, como se segue. Na hidrólise alcalina, o resíduo foi incubado durante 16 h, no escuro, com 12 mL de água e 5 mL de NaOH (10 M) à temperatura ambiente com agitação orbital (Biomixer VDRL Kline com temporizador TS 2000A). Posteriormente, o pH foi ajustado para 2,0 com HCl concentrado e a mistura foi extraída com 10 mL de acetato de etila, centrifugada (2500 x *g*, 5 minutos, 10 ºC) e, após recolher o sobrenadante, o resíduo foi re-extraído mais duas vezes nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram combinados, o solvente foi evaporado em rotaevaporador, o resíduo seco foi reconstituído em 10 mL de metanol:água (80:20, *v*/*v*) e armazenado a -20 ºC até o momento da análise.

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

Os resultados obtidos a partir da análise dos extratos obtidos após as hidrólises alcalina e ácida foram combinados para representar o teor de compostos fenólicos insolúveis. O teor total de compostos fenólicos é representado pela soma do teor de compostos fenólicos solúveis e insolúveis.

Todos os extratos foram filtrados através de filtros de membrana de éster de celulose de 0,45 µm (Analítica, Brasil) antes da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Condições cromatográficas

O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®, Japão) incluiu bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos modelo SDP-MD20A, auto injetor SIL-20AHT, e degaseificador DGU-20A5, pseudo gerenciado por um controlador CBM-20A, conectado diretamente a um computador equipado com o Software LabSolutions (Shimadzu Corporation®, versão 5.82, 2015).

A separação cromatográfica de compostos fenólicos não antocianinas foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa (C18, 5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Phenomenex®). Foi utilizado um sistema gradiente de eluição composto por duas fases: solução aquosa de ácido fórmico 1% (eluente A) e acetonitrila (eluente B), com fluxo de 1,0 mL/min. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 18% do eluente B. Após a injeção da amostra, essa proporção amentou para 20% de B em 1 min, 43% de B em 18 min e 85% de B em 23 min, sendo mantida constante até 30 min. Entre as injeções, intervalos de 10 min 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 separação cromatográfica das antocianinas foi realizada usando uma coluna de fase reversa (C18, 5 µm, 150 mm × 4,6 mm, Phenomenex®). Foi utilizado um sistema gradiente de eluição composto por duas fases: ácido fórmico 1% e acetonitrila 2% em água milli-Q (eluente A) e ácido fórmico 1% e acetonitrila 2% em metanol (eluente B), com fluxo de 1,0 mL/min. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 23% de eluente B. Após a injeção da amostra, essa proporção permaneceu constante até 2 min e aumentou para 95% de B em 10 min e em seguida, diminuiu para 23% de B em 11 min, sendo mantida constante até 20 min. Entre as injeções, intervalos de 10 min foram utilizados para re-equilibrar a coluna com 23% do eluente B. As antocianinas foram monitorados por detector DAD no comprimento de onda de 530 nm.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação com o tempo de retenção e o espectro de absorção do respectivo padrão e a quantificação foi realizada por calibração externa. Os dados foram adquiridos pelo *Software LabSolutions* (Shimadzu Corporation®, versão 5.82, 2015).

2.7. Análise sensorial e microbiológica

Todos os pães foram analisados para pesquisa de coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella sp* (APHA, 2001), de acordo com os padrões da RDC nº 12 (ANVISA). As análises foram realizadas por uma empresa terceirizada em no máximo 24 h após o preparo das mesmas.

Os pães foram avaliados por 100 provadores não treinados no dia seguinte ao preparo dos mesmos. A aceitação do produto foi avaliada por intermédio de uma escala hedônica de nove pontos, tendo como pontos de âncora superior e inferior as expressões “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”, respectivamente, e como ponto central “não gostei nem desgostei”. Os parâmetros testados foram aspecto global, cor da casca, cor do miolo, textura, sabor, sabor residual e aroma.

Primeiramente, os participantes responderam um questionário pessoal que caracteriza o perfil dos provadores (**Anexo 1**).

A intenção de consumo foi mensurada por meio de uma escala hedônica de 7 pontos, tendo como ponto de âncora superior e inferior as expressões “comeria sempre” e “nunca comeria”, respectivamente, e como ponto central “comeria ocasionalmente”.

A intenção de compra foi avaliada com o emprego de escala hedônica de cinco pontos, tendo como pontos de âncora superior e inferior as expressões “certamente compraria” e “certamente não compraria”, respectivamente, e como ponto central “talvez compraria, talvez não compraria” (MEILGAARD et al., 2007). Todos os questionários encontram-se detalhados nos **Anexos 2 e 3**.

As análises foram realizadas em laboratório livre de odores e cores fortes. As amostras foram expostas em recipientes idênticos, codificadas com números aleatórios de três dígitos e cada amostra recebeu um número diferente. As amostras (pão integral e pão de jabuticaba) foram oferecidas ao mesmo tempo, juntamente a um copo de água. As porções foram oferecidas com casca e miolo e seu tamanho foi retangular com 2 cm de largura e 3 cm de comprimento.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 4**). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ (parecer n° 1.067.045).

2.8. Análises estatísticas

O efeito do tempo de armazenamento sobre a capacidade antioxidante e os teores de compostos fenólicos da farinha de jabuticaba foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA-*one way*), seguida de pós-teste de Tukey.

Os resultados da análise sensorial e os resultados da composição centesimal dos pães foram avaliados por meio de Teste *t* pareado.

O efeito da substituição parcial da farinha de trigo integral pela farinha de jabuticaba e o efeito da panificação/cocção sobre a capacidade antioxidante e os teores de compostos fenólicos foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA-*two way*), seguida de pós-teste de Tukey.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software Graph PadPrism 5.0 e foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização da farinha de jabuticaba e efeito da estocagem

3.1.1. Composição centesimal, parâmetros físicos e químicos

A farinha de jabuticaba foi obtida por secagem em estufa das cascas e sementes da jabuticaba, gerando rendimento de 20%. A composição centesimal da farinha de jabuticaba está apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição centesimal da farinha de jabuticaba[1].

(%)	Farinha de jabuticaba
Umidade	10,7±2,5
Resíduo mineral fixo	2,7±0,07
Proteínas	2,6±0,1
Lipídeos	0,8±0,1
Fibras solúveis	1,6±0,2
Fibras insolúveis	39,3±0,6
Carboidratos	42,3±0,9
Kcal total	186,6

[1]Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de triplicata.

Adicionalmente, os teores de resíduo mineral fixo, proteínas e lipídeos também estão de acordo com os relatados na literatura para o subproduto da jabuticaba (DESSIMONI-PINTO et al., 2011). Resultados semelhantes foram encontrados na farinha de subproduto da jabuticaba obtida a partir de frutas adquiridas em Santa Catarina, que apresentou 11,5 g/100 g de umidade, 2,4 g/100 g de resíduo mineral fixo, 1,3 g/100 g de proteínas e 0,3 g/100 g de lipídeos (GURAK et al., 2014).

No entanto, ao avaliar os teores de fibras, os dados observados encontram-se maiores ou menores quando comparado aos outros estudos da literatura. LEGATTI et al. (2012) relataram teores de fibras solúvel e insolúvel na farinha da casca da jabuticaba de 5% e 20%, respectivamente. Apesar dos teores de fibras terem sido diferentes ao observado no presente trabalho, a distribuição entre fibra solúvel e insolúvel foi similar. Isso pode ter ocorrido por apesar de LEGATTI et al. (2012) também terem utilizado um método enzimático-gravimétrico para avaliar os teores de fibras de suas amostras, as enzimas utilizadas foram diferentes das usadas na presente dissertação: pepsina, pancreatina e alcalase (ASP et al., 1983) e eles trabalharam com a

casca apenas. Em contraste, GURAK et al. (2014) relataram teores de fibras solúvel e insolúvel na farinha de jabuticaba de 10,7% e 6,5%, respectivamente. Além dos teores relatados terem sido menores do que os observados, a distribuição também foi diferente. GURAK et al. (2014) utilizaram o mesmo método enzimático-gravimétrico para avaliar os teores de fibras de suas amostras, mas a farinha produzida em seu trabalho foi desenvolvida apenas com a casca da jabuticaba e não com a casca e a semente, o que pode ter influenciado nos teores inferiores de fibras do produto final.

A farinha de jabuticaba apresentou um pH ácido (3,3), fator importante, visto que as antocianinas, principal classe de compostos fenólicos da farinha de jabuticaba, é mais estável em pH ácido (FERNANDES et al., 2008). Adicionalmente, torna o meio menos propício para o desenvolvimento de microrganismos.

As coordenadas colorimétricas caracterizam a farinha de jabuticaba com baixa luminosidade (L^* = 38,1) e destacam a presença das colorações vermelho (a^* = 15,1) e amarelo (b^* = 4,4) (**Figura 1**). Essas coordenadas encontram-se um pouco diferentes das relatadas na literatura (GURAK et al., 2014), no qual a farinha de jabuticaba foi caracterizada por uma coloração mais escura e avermelhada (L^* = 32,0; a^* = 37,7; b^* = 7,5) provavelmente devido ao fato de que a farinha foi obtida por liofilização e não por desidratação em estufa, conforme desenvolvida nesse trabalho.

Ao final do armazenamento da farinha (após 90 dias), observou-se que a luminosidade e a coloração vermelha reduziram e o contrário foi observado para a coloração amarela (L^* = 35,4; a^* = 13,8; b^* = 5,9), demonstrando que a farinha se tornou mais escura ao longo do tempo e que as antocianinas, caracterizadas pelos tons arroxeados e vermelhos, se degradaram. Esse padrão de alteração de cor pode ser observado desde o trigésimo dia de armazenamento (**Figura 1**).

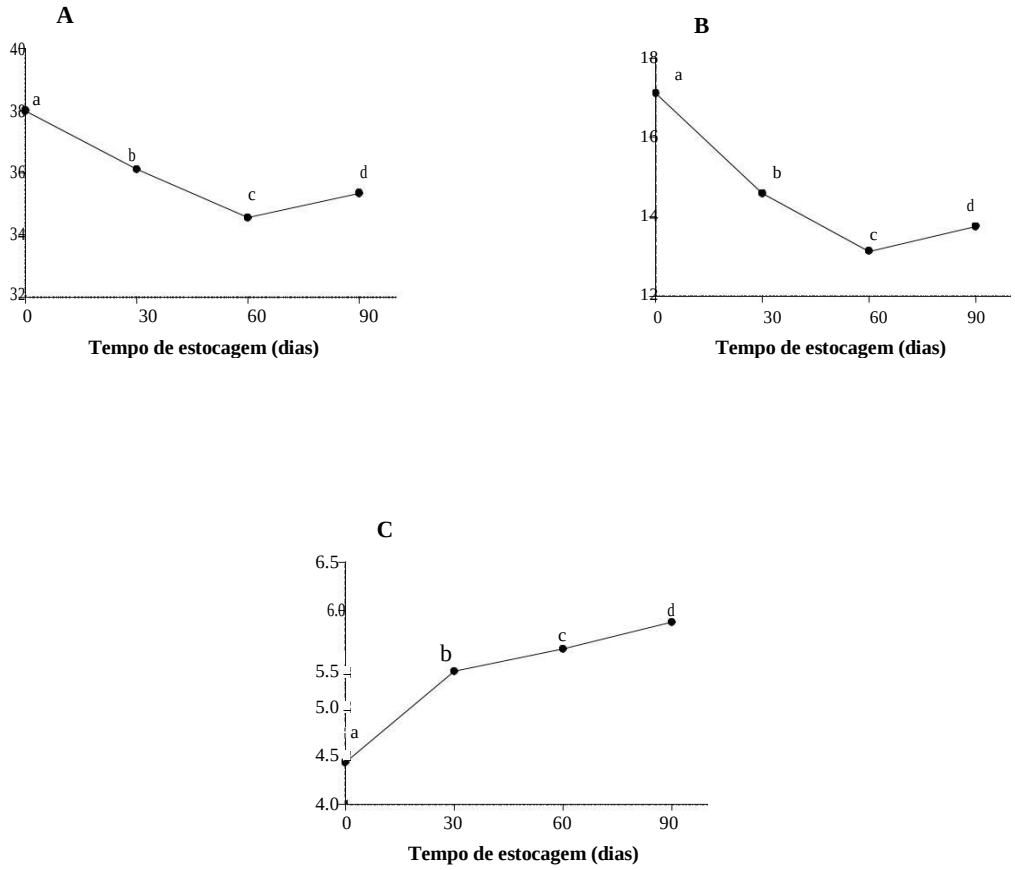

Figura 1. Coordenadas colorimétricas avaliadas por *L** (**A**), **a* (**B**) e **b* (**C**) na farinha de jabuticaba ao longo de 90 dias de armazenamento. Resultados expressos como média±desvio padrão de três replicatas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias (One-way Anova, seguido de pós-teste de tukey, $p<0,05$).

3.1.2. Perfil de compostos fenólicos

Foram identificados e quantificados na farinha de jabuticaba nove compostos fenólicos (ácidos elágico, gálico, *m*-cumárico e miricetina, quercetina, miricetina-3-*O*-ramnosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, delfinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo) (**Tabela 2**). Desses, as antocianinas (delfinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo) estavam presentes apenas na fração solúvel e a cianidina-3-*O*-glicosídeo foi o fenólico mais abundante na jabuticaba (36%), corroborando com relatados da literatura (INADA et al., 2015; REYNERTSON et al., 2008; WU et al., 2012). Todos os compostos fenólicos identificados na farinha de jabuticaba já foram previamente identificados na fruta (INADA et al., 2015; PLAZA et al., 2016; WU et al., 2013).

Tabela 2. Teor de compostos fenólicos (mg/100g, bs) da farinha de jabuticaba ao longo 90 dias de armazenamento[1].

Composto	Extrato	Tempo de armazenamento (dias)			
		0	**30**	**60**	**90**
Ácido gálico	*Fração solúvel*	37,4±0,1[a]	64,1±18,3[a,d]	91,1±3,1[b,d]	22,9±1,4[a,c]
Ácido *m*-cumárico		0,2±0,00[a]	ND[2]	ND[2]	ND[2]
Miricetina-3-*O*-ramnosídeo		3,6±0,3[a]	ND[2]	ND[2]	ND[2]
Quercetina-3-*O*-rutinosídeo		19,4±1,3[a]	6,7±0,6[b]	7,3±0,3[b]	9,5±1,0[b]
Ácido elágico		74,1±8,4[a]	120,3±1,1[c]	105,9±5,7[a]	32,1±2,1[b]
Miricetina		1,6±0,1[a]	0,9±0,0[b]	ND[2]	ND[2]
Quercetina		0,3±0,0[a]	0,2±0,0[b]	ND[2]	ND[2]
Delfinidina-3-*O*-glicosídeo		71,1±0,3[a]	50,0±3,1[b]	47,7±0,4[b]	49,7±3,6[b]
Cianidina-3-*O*-glicosídeo		611,1±5,1[a]	412,0±26,5[b]	388,9±18,9[b]	446,6±46,6[b]
Subtotal		*818,6±16,2*[a]	*705,1±61,1*[b,c]	*671,6±19,1*[a,c]	*498,7±23,8*[b,c]
Ácido gálico	*Fração insolúvel*	50,5±0,4[a]	47,9±0,3[a]	43,5±0,3[a,b]	52,4±4,2[a,c]
Miricetina-3-*O*-ramnosídeo		3,2±0,2[a]	ND[2]	ND[2]	ND[2]
Quercetina-3-*O*-rutinosídeo		11,9±1,4[a]	8,8±1,0[a]	8,1±0,2[a,b]	4,2±0,4[b]
Ácido elágico		783,0±15,1[a]	372,5±21,1[b]	414,2±22,7[b,c]	329,6±5,1[b,d]
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico		15,4±1,5[a]	7,8±0,5[b]	5,7±0,3[b]	6,6±0,3[b]
Miricetina		1,3 ±0,0[a]	0,8±0,0[a]	ND[2]	ND[2]
Quercetina		3,2±0,1[a]	3,1±0,1[a]	ND[2]	ND[2]
Subtotal		*853,0±12,9*[a,b]	*433,0±22,4*[a]	*500,0±25,7*[a]	*386,8±9,7*[a,c]
Total		**1.679,8±8,3**[a]	**1.146,4±83,3**[b,c]	**1.177,5±44,4**[c]	**892,2±14,4**[d]

[1]Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de três replicatas. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias (One-way Anova seguido de pós-teste de Tukey, $p<0,05$). [2]Não detectado.

O teor total de compostos fenólicos na farinha de jabuticaba no tempo zero (após a obtenção) foi de 1.680 mg/100 g (**Tabela 2**), sendo 49% do total encontrado sob a forma solúvel e 51% na forma insolúvel. Esses dados são semelhantes aos encontrados por INADA et al. (2015), que avaliaram o subproduto despolpado da jabuticaba e encontraram um total de compostos fenólicos de 1.658 mg/100 g. No entanto, diferente do encontrado no presente trabalho, INADA et al. (2015) relataram que 74% do teor total dos compostos fenólicos estava presente sob a forma solúvel. É importante destacar que esses autores empregaram a liofilização ao subproduto da jabuticaba, o que pode ter favorecido essa mudança de perfil. As principais diferenças observadas no perfil dos compostos fenólicos estão relacionadas ao teor de antocianinas (sendo no presente estudo observado menor teor), e ao teor dos ácidos gálico e elágico (fração insolúvel), sendo no presente estudo apresentado teores mais elevados. Tais achados provavelmente podem ser atribuídos ao processo de desidratação empregado no presente extrato, que é associado ao calor e pode ter favorecido a degradação das antocianinas e a hidrólise de galotaninos e elagitaninos em ácido gálico e elágico, respectivamente (HAGER et al., 2010; MERCALI et al., 2015; PLAZA et al., 2016; SANTOS et al., 2012; WU et al., 2012).

Este perfil também pode ter sido alterado visto que a matéria-prima utilizada no trabalho de INADA et al. (2015) e no presente trabalho foi a mesma, e o tempo de armazenamento dos subprodutos até as análises realizadas no presente trabalho foi maior ao tempo de armazenamento do trabalho de INADA et al. (2015), o que pode ter levado a uma degradação maior das antocianinas dos subprodutos de jabuticaba, mesmo tendo sido armazenada sob refrigeração e a vácuo. O aumento do teor de ácido gálico também pode ser associado à redução do conteúdo de delfinidina-3-*O*-glicosídeo, uma vez que o ácido gálico é um produto de degradação desse composto formado pela fissão do anel B da delfinidina (SINELA et al., 2017).

Ao final do armazenamento foi observada uma redução de 47% no teor total dos compostos fenólicos, sendo respectivamente de 39% na fração solúvel e 55% na insolúvel (**Tabela 2**). No tempo inicial, os principais compostos fenólicos não antocianinas presentes na fração solúvel são os ácidos elágico e gálico, e os fenólicos antocianinas são a delfinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo (**Tabela 2**). Desses, somente o ácido gálico não apresentou redução ao final de 90 dias de armazenamento. Pelo contrário, foi observado um aumento de 59% no teor deste ácido após 60 dias de armazenamento e aumento de 38% após 30 dias quando comparado com

o tempo zero. O mesmo aconteceu com o ácido elágico, porém com os percentuais de 62% e 43%, respectivamente. Adicionalmente a isso, pode-se observar uma redução de 57% no teor total do ácido elágico na fração solúvel após 90 dias de armazenamento (**Tabela 2**). Tal fato pode ser explicado pela possível despolimerização de galotaninos e elagitaninos (PLAZA et al., 2016; WU et al., 2012). A despolimerização de elagitaninos e galotaninos em ácido elágico e gálico durante o armazenamento a 25 °C em produtos provenientes de *berries* processados já foi relatada (HAGER et al., 2010; ZAFRILLA et al., 2001). Considerando que os elagitaninos e galotaninos não são absorvidos pelo organismo nas suas formas íntegras, a sua despolimerização para os ácidos elágico e gálico pode ser benéfica ao consumidor, pois esses compostos são mais biodisponíveis. Porém, após um tempo prolongado de armazenamento o aumento nos teores dos ácidos fenólicos na matriz da farinha de jabuticaba não se mantém, pelo contrário, os teores tendem a reduzir após 60 dias de armazenamento (**Tabela 2**).

Já em relação as antocianinas, a delfinidina-3-*O*-glicosídeo sofreu degradação de 30% após os 90 dias de armazenamento e cianidina-3-*O*-glicosídeo de 27%. Sabe-se que as antocianinas são compostos instáveis (INADA et al. 2015).

3.1.3. Capacidade antioxidante

Logo após a obtenção da farinha de jabuticaba (tempo zero de armazenamento), os valores de capacidade antioxidante avaliados pelos métodos FRAP, TEAC e *Folin-Ciocalteu* foram, respectivamente, 190,5 mmol Fe^{+2}/100 g, 157,3 mmol ET/100 g e, 7,5 g EAG/100 g (**Figura 1**). INADA et al. (2015), relataram valores de capacidade antioxidante da jabuticaba inferiores (71,2 mmol Fe^{+2}/100 g, 43,5 mmol ET/100 g e 6,0 g EAG/100 g) quando comparados ao presente estudo. Nossos resultados também se mostraram superiores em relação a capacidade antioxidante quando comparada a farinha de outras frutas, como damasco, camu-camu, framboesa, morango, *blueberry*, cereja, goiaba, *cranberry* e uva vermelha (BENNET et al., 2011; DE SOUZA et al., 2014; FRACASSETTI et al., 2013; NUNES et al., 2016; OSZMIANSKI et al., 2015; ZHAO et al., 2015).

Por outro lado, LENQUISTE et al. (2015), ao avaliarem a capacidade antioxidante de farinha de jabuticaba, obtiveram resultados superiores quando avaliado pelos métodos FRAP e TEAC (410,7 mmol Fe^{+2}/100 g e 223,1 mmol ET/100 g, respectivamente) e inferiores quando avaliado pelo método de *Folin* (3,6 g EAG/100 g).

Essas diferenças podem ser explicadas devido a origem de cultivo da fruta, à espécie de jabuticaba estudada bem como à forma de obtenção da farinha, visto que esses autores obtiveram a farinha de jabuticaba por liofilização. Já foi relatado na literatura que este método favorece a manutenção da capacidade antioxidante natural quando comparado com os métodos de desidratação que envolve calor, que pode ser o responsável pela degradação de compostos antioxidante (SOGI et al., 2015). Um trabalho foi encontrado na literatura, no qual obtivera farinhas com atividade antioxidante inferior a encontrada na farinha de jabuticaba obtida no presente trabalho (LEÃO et al., 2017). Isso pode ter ocorrido visto que a farinha preparada neste estudo não utilizou a semente em sua composição.

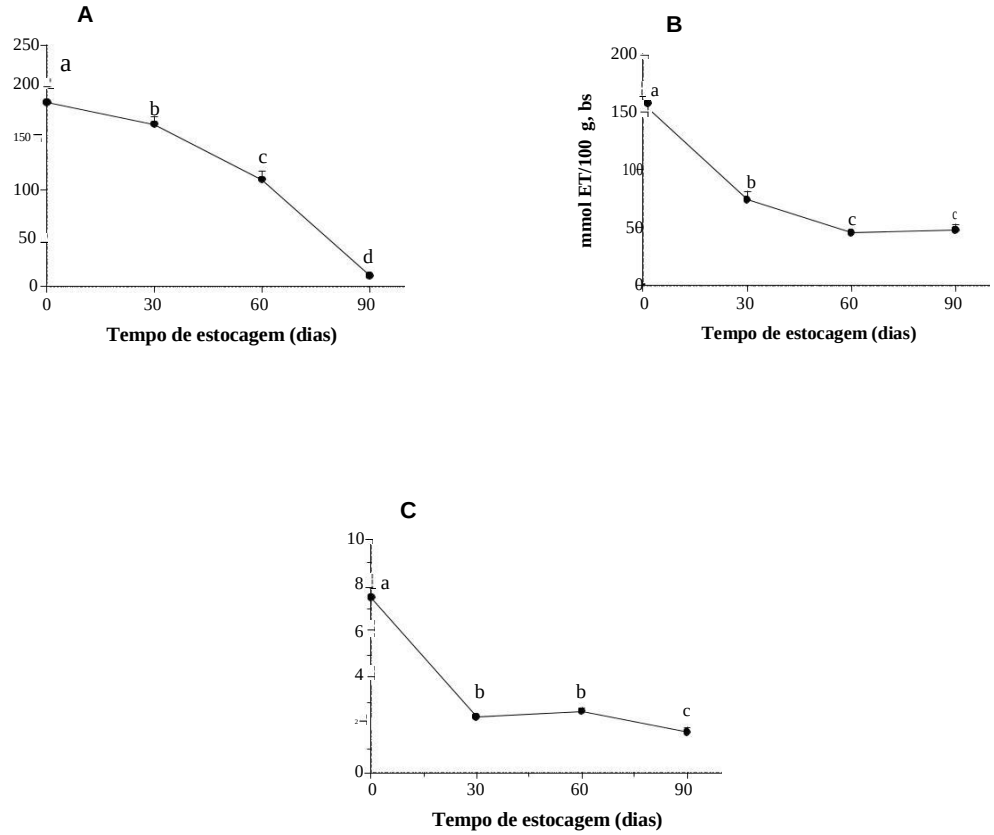

Figura 2. Capacidade antioxidante determinada pelos métodos FRAP (**A**), TEAC (**B**) e *Folin-Ciocalteu* (**C**) na farinha de jabuticaba ao longo de 90 dias de armazenamento. Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de três replicatas. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias, para o mesmo método (One-way Anova, seguido de pós-teste de tukey, $p<0,05$). EAG: equivalentes de ácido gálico

Após 90 dias de armazenamento foi observada uma redução da capacidade antioxidante de 94%, 71% e 77%, respectivamente, quando avaliada pelos métodos

FRAP, TEAC e *Folin-Ciocalteu* (**Figura 2**). Sabe-se que a jabuticaba é uma fruta rica em antocianinas (ALEZANDRO et al., 2013; INADA et al. 2015; PLAZA et al., 2016; WU et al., 2013) que se oxidam com facilidade (CHOI et al., 2002; GARCIA-VIGUERA & BRIDLE 1999), especialmente devido à exposição à luz, à altas temperaturas e ao pH alcalino (SANTOS et al., 2012; ZILIC et al., 2016). Portanto, a redução da capacidade antioxidante da farinha de jabuticaba ao longo do armazenamento pode ser atribuída à essa instabilidade das antocianinas, conforme será detalhado posteriormente.

3.2. Efeito da incorporação de farinha de jabuticaba em pães integrais

3.2.1. Composição centesimal e parâmetros físicos

Segundo a RDC nº 12 (1978), é definido como "pão integral" o produto preparado com no mínimo 50% de farinha de trigo integral. No presente trabalho o pão integral foi preparado com 100% de farinha de trigo integral e o pão de jabuticaba com 90% de farinha de trigo integral, permanecendo assim dentro dos valores preconizados pela legislação. Além disso, em relação a umidade, o pão integral preparado (PI) também se encontra dentro do preconizado pela legislação (**Tabela 3**), apresentando um percentual abaixo de 38% (BRASIL, 2000), importante para evitar que microrganismos se desenvolvam e se proliferem, reduzindo assim o tempo de prateleira do produto e o tornando impróprio para consumo em pouco tempo. Em relação ao pão de jabuticaba (PJ), não existe legislação que tenha definido parâmetros relacionados à composição centesimal de pães adicionados de farinhas de frutas. Entretanto, foi observado um aumento na umidade ao se adicionar a farinha de jabuticaba na sua composição do pão elaborado. Da mesma forma, houve um aumento no teor de fibras neste pão. Sugere-se então que a ligação das moléculas de água as fibras adicionadas possam ter dificultado a evaporação de água durante a cocção, aumentando a umidade do produto final.

Tabela 3. Composição centesimal dos pães elaborados (g/100g, bs)[1].

	Pão integral	**Pão de jabuticaba**
Umidade (%)	37,9±0,2[a]	39,9±0,3[b]
Resíduo mineral fixo (%)	2,3±0,2[a]	3,0±0,1[b]
Proteínas (%)	10,4±0,1[a]	9,1±0,4[b]
Lipídeos (%)	0,8±0,1[a]	1,4±0,0[b]
Fibras solúveis (%)	0,7±0,00[a]	1,2±0,2[a]
Fibras insolúveis (%)	15,7±0,2[a]	25,9±0,5[b]
Carboidratos (%)	42,3±0,9[a]	25,7±0,2[b]
Kcal total	187	138

[1]Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de triplicata. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (Teste *t* não-pareado, $p<0,05$).

A adição de FJ promoveu o aumento dos teores de resíduo mineral fixo, lipídeos e fibras insolúveis e redução nos teores de proteínas e carboidratos do pão de jabuticaba (**Tabela 3**), demonstrado que mesmo em um percentual pequeno (10%), a substituição da farinha de trigo integral pela farinha de jabuticaba altera a composição centesimal final do produto. De acordo com a Portaria nº 57 (ANVISA, 2012, o alimento que contiver no mínimo de 3,0 g de fibra alimentar/100 g pode receber a informação nutricional complementar (INC) de "fonte de fibra" e o alimento que contiver no mínimo 6,0 g de fibra alimentar/100 g pode receber a INC de "alto conteúdo" de fibra. Portanto, ressalta-se que os pães desenvolvidos no presente estudo podem receber a alegação de alto conteúdo de fibra. A OMS (Organização mundial da saúde) preconiza a ingestão de pelo menos 25 g a 30 g de fibras ao dia. Para atingir este valor, seriam necessárias três fatias e meia (50 g cada) de pão integral e apenas duas fatias do pão adicionado de farinha de jabuticaba, caso não seja ingerida outra fonte de fibra, o que é algo interessante, visto que seria possível ingerir a mesma quantidade de fibras e obter o mesmo benefício em uma densidade calórica inferior.

A altura do PJ (8 cm) foi inferior à do PI (10,5 cm). O rendimento também foi inferior para o PJ (60%) quando comparado ao PI (82%). O principal aspecto negativo relacionado ao uso de farinha de frutas em produtos de panificação é a qualidade de cozimento devido a diminuição da quantidade de proteínas de glúten e ao alto teor de fibras dietéticas (ALTUNKAYA et al., 2013). Na massa preparada com farinha de trigo, a hidratação e a mistura resultam no desenvolvimento de uma matriz estabilizada com glúten que retém o dióxido de carbono produzido durante a fermentação. O desenvolvimento de gás durante o processo térmico é responsável pelo desenvolvimento

de um volume e de uma textura ideias para o pão, através da transferência de calor pela rede de glúten e gelatinização do amido (MIHHALEVSKI et al., 2012). O amido, parcialmente cristalino, da farinha é transformado em grânulos de amido gelatinizados e inchados com água. Outra parte desses polímeros de amido (amilose e também amilopectinas degradadas) lixiviam do grânulo, formando uma rede de emaranhamento de amido gelatinizado entre a matriz de glúten e grânulos de amido (HUG-ITEN et al., 1999). Dessa forma, a retirada de parte da farinha de trigo a adição de farinha de jabuticaba, pode resultar em características indesejáveis aos produtos finais, tais como volume de pão reduzido, casca endurecida e sabor amargo (KTENIOUDAKI and GALLAGHER, 2012).

Foi observado que a cocção dos pães promoveu a redução do pH no pão de jabuticaba, mas não teve diferença significativa no pão integral (**Tabela 4**). Ao analisar a cor dos pães, foi visto que a luminosidade de ambos os pães (integral e de jabuticaba) foi inferior do que a luminosidade das massas cruas (**Tabela 4**). Durante o processamento térmico de alimentos, ocorre uma série de reações que favorecem a mudança de coloração, sendo a Reação de Maillard a mais importante em produtos de panificação. Essa reação é iniciada com o aquecimento ocorre através da interação do grupo carbonila livre (presente em açúcares redutores, por exemplo) com o grupo amino (presente em aminoácidos, peptídeos ou proteínas, por exemplo). À medida que a reação progride, uma grande variedade de produtos é formada por complexas reações simultâneas, gerando as melanoidinas, responsáveis pela coloração marrom dos alimentos (BORRELLI et al., 2003). Portanto, é possível explicar que após serem assados, os pães se tornaram mais escuros devido a formação desses produtos de cor escurecida provenientes da Reação de Maillard e também devido a caramelização dos açúcares presentes no pão. Foi possível observar também que a cocção reduziu os tons vermelhos do pão de jabuticaba (devido, provavelmente, a degradação das antocianinas) e aumentou no pão integral com a formação de produtos da reação e Maillard, como as melanoidinas. Além disso, aumentou o amarelado de ambos os pães (**Tabela 4**).

Ao comparar os valores de pH, observa-se que o pão de jabuticaba possui pH inferior ao pão integral (**Tabela 4**), visto que o pH da farinha de jabuticaba é inferior ao pH da farinha de trigo integral. Ainda, o pão de jabuticaba possui maior luminosidade e intensidade de amarelo e vermelho (**Tabela 4**).

Tabela 4. Valores de pH e coordenadas colorimétricas das massas cruas e dos pães elaborados[1].

	Massa crua (PI)	Pão integral	Massa crua (PJ)	Pão de jabuticaba
pH	5,7±0,0^{aB}	5,8±0,0^{bB}	4,9±0,0^{aA}	4,7±0,0^{aA}
Coordenadas colorimétricas				
*L**	56,9±0,0^{aB}	51,3±0,0^{bB}	35,6±0,0^{aA}	33,2±0,0^{bA}
*a**	5,6±0,0^{aB}	8,2±0,0^{bB}	14,4±0,0^{aA}	9,1±0,1^{bA}
*b**	17,9±0,0^{aB}	22,5±0,0^{bB}	4,1±0,0^{aA}	9,2±0,0^{bA}

[1]Resultados expressos como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre a massa crua e o pão, para um mesmo tipo de pão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os diferentes tipos de pão (One-way Anova, seguido de pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

3.2.2. Teor de compostos fenólicos

Tanto a massa crua quanto o pão da formulação adicionada de farinha de jabuticaba apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, em todas as frações (**Tabela 5**). Estes teores aumentaram, principalmente, devido a presença das antocianinas encontradas na farinha de jabuticaba (delfinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidia-3-*O*-glicosídeo) e dos ácidos gálico e elágico, também presentes nessa farinha. A maior parte dos compostos fenólicos, nos pães coccionados ou não, se encontra na fração insolúvel (**Tabela 5**). Nas formulações controle, 100% dos compostos foram identificados nessa fração e nas formulações com adição de farinha de jabuticaba ,55% e 92% foram encontrados, respectivamente, na massa crua e no pão. Na massa crua integral e no pão integral, o ácido ferúlico foi o único composto identificado. Entretanto, este foi encontrado somente nas frações insolúveis e principalmente após a hidrólise alcalina (87%, em média) (**Tabela 5**).

A cocção promoveu o aumento de 13% no teor total de compostos fenólicos do pão integral**,** ao passo que no pão de jabuticaba foi observada uma redução de 19% (**Tabela 5**). Essa redução pode ser associada diretamente a extensa degradação (93%) das antocianinas durante a cocção que são sensíveis ao aquecimento e representam quase metade dos compostos fenólicos do pão cru (BAKOWSKA et al., 2003; GÓRNÁS et al., 2016; INADA et al., 2015; MERCALI et al., 2015; SINELA et al., 2017). Na massa crua de jabuticaba, os principais compostos foram a cianidina-3-*O*-glicosídeo (38%), ácido ferúlico (29%), ácido gálico (22%), ácido elágico (7,5%) e a delfinidina-3-*O*-glicosídeo (4,5%). No pão de jabuticaba, os principais compostos fenólicos foram o ácido ferúlico (43%), ácido gálico (27%), ácido elágico (26%),

cianidina-3-*O*-glicosídeo (2,7%) e delfinidina-3-*O*-glicosídeo (1,3%) (**Tabela 5**).

Por outro lado, a cocção do PJ promoveu o aumento dos teores do ácido gálico na fração solúvel (74%). ZILIC et al. (2016) desenvolveram *cookies* de milhos vermelho e azul ricos em antocianinas e observaram aumento dos teores de compostos fenólicos solúveis após a cocção. Também foi observado redução dos teores de antocianinas após a aplicação de calor, assim como foi observado no presente estudo. O estudo de ABDEL-AAL & RABALSKI (2013) mostrou que o cozimento de um muffin de farinha de einkorn pode liberar ácidos fenólicos e seus derivados, resultando em um aumento de compostos fenólicos solúveis.

O efeito do processo de cocção sobre os teores de compostos fenólicos ainda é controverso. Apesar de GELINAS & MCKINNON (2006) terem relatado um aumento desses compostos durante a cocção, LEENHARDT et al. (2006) relataram que os compostos fenólicos são destruídos durante esse processamento (KTENIOUDAKI et al., 2015). Segundo SAA et al. (2017), o processo de cocção influencia nas propriedades funcionais do pão, levando a reorganização molecular de alguns compostos bioativos, gerando sua solubilização.

Uma hipótese é que as formas conjugadas com glicosil destes compostos fenólicos poderiam ter sido liberadas diretamente pela ação de β-glicosidases de levedura (HUR et al., 2014). Os processos de fermentação e cozimento influenciam as propriedades funcionais do pão, levando a reorganização molecular de alguns compostos bioativos se apresentando mais em suas formas solubilizadas, o que pode ser potencializado pelo processo de acidificação. Por outro lado, um ciclo de cocção de longa duração/alta temperatura pode reduzir fortemente essas últimas vantagens (SAA et al., 2017). Além disso, foi relatado que as bactérias do fermento são capazes de catabolizar os compostos fenólicos, especialmente através da descarboxilação, a fim de obter energia, o que pode reduzir a concentração de alguns compostos fenólicos (ALVES & PERRONE, 2015). Porém, entre a massa crua e o pão preparado no presente estudo não foi possível diferenciar o efeito da cocção ou da fermentação. Seria necessário, em trabalhos futuros, realizar uma outra amostra: coccionada e não fermentada e crua não fermentada.

Durante a cocção, pode ocorrer a incorporação de melanoidinas através da reação de Maillard. Estes compostos dispõem de intensa capacidade antioxidante (DELGADO-ANDRADE& MORALES, 2005) e, por possuirem alto peso molecular, podem se ligar a outros compostos fenólicos durante a cocção, como o ácido

clorogênico, que também é um ácido hidroxicinâmico, assim como o ácido ferúlico, presente na farinha de trigo (ALVES & PERRONE, 2015).

Ao se comparar o efeito da cocção entre os pães, é possível afirmar que a cocção influencia positiva ou negativamente os teores de compostos fenólicos, dependendo de suas inter/intraligações. Isso se deve, também devido a alteração de temperatura durante a cocção, que libera os compostos ligados às paredes celulares da matriz alimentar, deixando-os em suas formas solúveis. De fato, é possível observar que após a cocção houve o aumento do teor de ácido gálico na fração solúvel do pão de jabuticaba, possivelmente associado com a redução desse composto na fração insolúvel, obtida após a hidrólise ácida (**Tabela 5**). Do ponto de vista biológico, isso pode ser relevante visto que, de maneira geral, os compostos fenólicos solúveis são mais bioacessíveis no organismo humano (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Além disso, nos pães de jabuticaba, a cocção também gerou um aumento do teor do ácido elágico na fração insolúvel. Segundo ZAUPA et al. (2015), compostos fenólicos podem alcançar resultados contrastantes após a cocção, possivelmente devido a: liberação parcial da forma encadeada com o consequente aumento na fração solúvel; diminuição dos teores na fração solúvel devido a degradação térmica e; aumento da forma ligada causada por interações de compostos fenólicos com macromoléculas da matriz alimentar.

Já foi relatado na literatura que o tratamento térmico do fonio (cereal integral) ocasionou aumento do teor de quase todos os compostos fenólicos, exceto o ácido gálico, que permaneceu estável (N'DRI et al., 2012). O aumento mais evidente foi para o ácido ferúlico (N'DRI et al., 2012), assim como o observado no presente trabalho (**Tabela 5**). De acordo com os autores, o processamento pode causar a despolimerização de estruturas oligoméricas e poliméricas em dímeros e trímeros, promovendo concomitantes reações de polimerização e favorecendo a formação de complexos fortes de fenóis solúveis com macromoléculas da matriz alimentar, o que pode reduzir a sua solubilidade (N'DRI et al., 2012).

Tabela 5. Teor de compostos fenólicos (mg/100g, bs) nas massas cruas e nos pães elaborados[1].

Composto	**Extrato**	**Integral**		**Jabuticaba**	
		Massa crua	**Pão**	**Massa crua**	**Pão**
Ácido gálico	*Fração solúvel*	0,0±0,0^{aA}	0,0±0,0^{aA}	2,7±0,01^{aB}	10,4±0,4^{bB}
Delfinidina-3-*O*-glicosídeo		0,0±0,0^{aA}	0,0±0,0^{aA}	14,3±1,1^{aB}	2,9±0,1^{bA}
Cianidina-3-*O*-glicosídeo		0,0±0,0^{aA}	0,0±0,0^{aA}	116,2±1,3^{aB}	6,4±0,2^{bA}
Subtotal		0,0±0,0^{aA}	0,0±0,0^{aA}	*133,0±1,1*^{aB}	*19,7±0,4*^{bB}
Ácido gálico	*Fração insolúvel*	0,0±0,0^{aA}	0,0±0, 0^{aA}	61,4±0,4^{aB}	53,3±0,3^{bB}
Ácido ferúlico		81,0±1,5^{aA}	94,8±0,1^{bA}	86,1±1,5^{aA}	102,9±2,7^{bA}
Ácido elágico		0,0±0,0^{aA}	0,0±0,0^{aA}	12,8±1,4^{aB}	62,7±2,7^{bB}
Subtotal		*81,0±1,5*^{aA}	*94,8±0,1*^{bA}	*160,4±1,2*^{aB}	*218,8±0,2*^{bB}
Total		**81,0±1,5^{aA}**	**94,8±0,1^{bA}**	**294,5±2,9^{aB}**	**239,2±1,7^{bB}**

[1]Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre a massa crua e seu respectivo pão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os diferentes tipos de pão, para um mesmo grau de cocção (Two-Way Anova seguido de pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

3.2.3. Capacidade antioxidante

Ao comparar os dois pães, observa-se que a adição da farinha de jabuticaba promoveu aumento da capacidade antioxidante quando avaliada pelos três métodos (**Figura 3**). Outros autores já relataram que a incorporação de farinha de frutas aos produtos de panificação favorece o aumento da capacidade antioxidante (ALTUNKAYA et al., 2013; ALVES & PERRONE 2015; BHOL et al., 2016; CASTELO-BRANCO et al., 2016; HO et al., 2013; RAMÍREZ-MAGANDA et al., 2015).

Para o pão integral, observa-se que o processo de cocção promoveu a redução da capacidade antioxidante quando avaliada pelos métodos FRAP (25%) e *Folin-Ciocalteu* (27%) (**Figura 3**). No entanto, ao avaliar a capacidade antioxidante pelo método TEAC não foi observada diferença (**Figura 3**). Para o pão de jabuticaba não foi observado o mesmo comportamento, tendo a cocção promovido um aumento de, respectivamente, 21%, 37% e 54% na capacidade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP, TEAC e *Folin-Ciocalteu* (**Figura 3**). Isso pode ser atribuído a diferença do perfil de compostos fenólicos entre os pães assim como foi discutido no subcapitulo 3.2.2. e a sensibilidade de cada tipo de método aplicado, visto que os compostos encontrados na farinha do subproduto da jabuticaba (e não na farinha integral) é caracterizado por ligações glicosídicas, enquanto os compostos encontrados na farinha integral são reconhecidos por suas ligações ésteres, por exemplo.

De acordo com ABDEL-AAL & RABALSKI (2013), a cocção dos produtos de panificação pode afetar positivamente ou negativamente o teor de compostos fenólicos devido a exposição a temperaturas elevadas. Essa alteração depende do teor de gordura da matriz a ser processada, dos tipos de compostos fenólicos que essa matriz apresenta, dos ingredientes que compõe essa matriz, do recipiente em que esta será aquecida e das condições de aquecimento. Ao se adicionar a farinha de jabuticaba aos ingredientes da preparação, os tipos de compostos fenólicos se alteraram. Como foi visto anteriormente na **Tabela 5**, o composto predominante do pão integral foi o ácido ferúlico, que apresenta a ligação éster em sua molécula. Já os compostos fenólicos provenientes da jabuticaba, como o ácido gálico e elágico, são reconhecidos por possuírem ligações beta glicosídicas, gerando assim uma reação diferente frente a cocção (ROTHWELL et al., 2015).

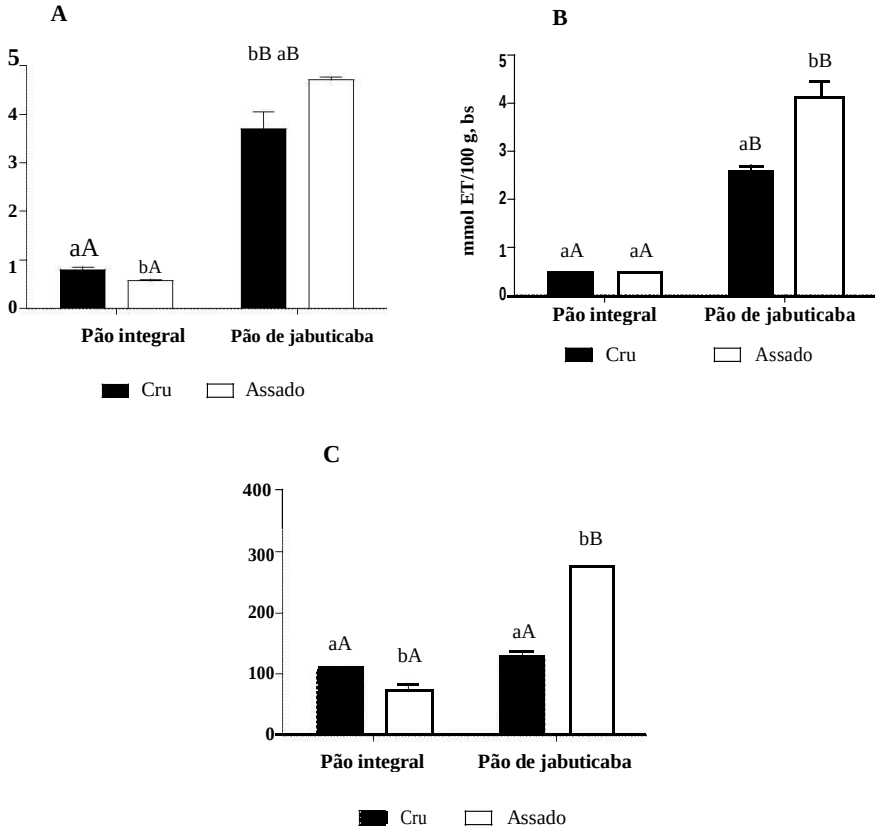

Figura 3. Capacidade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP (**A**), TEAC (**B**) e *Folin-Ciocalteu* (**C**) nas massas cruas e nos pães elaborados. Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre a massa crua e o pão, para um mesmo tipo de pão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os diferentes tipos de pão, para um mesmo grau de cocção (One-way Anova, seguido de pós-teste de Tukey, $p<0,05$). EAG: equivalentes de ácido gálico

3.3. Qualidade microbiológica e análise sensorial

Ambos os pães apresentaram qualidade microbiológica dentro do preconizado pela RDC n° 12 (ANVISA), demonstrando ausência de coliformes a 45 ^{o}C e salmonela.

A análise sensorial do pão integral e do pão de jabuticaba foi realizada por 100 consumidores não treinados, sendo 78% do sexo feminino. A média de idade dos provadores foi de 25 anos.

Somente para o atributo aroma não foi observada diferença significativa entre as notas atribuídas ao pão integral e ao pão de jabuticaba (**Tabela 6**). Para todos os outros atributos, o pão de jabuticaba obteve notas menores quando comparado ao pão integral (**Tabela 6**). Outros autores também observaram que os pães produzidos com 10% de substituição da farinha de trigo por farinhas de frutas mostraram pontuação semelhante

para o aroma comparado aos pães controle (ALTUNKAYA et al., 2013; CASTELO-BRANCO et al., 2016). Entretanto, mesmo obtendo notas inferiores quando comparado ao pão integral, todos os atributos avaliados do pão de jabuticaba se mantiveram acima da média mínima de aceitação (maior ou igual a 5, gostei ligeiramente) (**Tabela 6**).

As intenções de consumo e de compra também foram menores para o pão de jabuticaba em relação ao pão integral (**Tabela 6**). Tais resultados podem ser atribuídos ao fato de a farinha de jabuticaba possuir um sabor adstringente.

Tabela 6. Perfil sensorial do pão de jabuticaba e do pão integral, (n=100)[1].

Aspectos	**Pão de jabuticaba**	**Pão integral**
Atributos[2]		
Impressão global	6,7±1,7[a]	7,6±1,4 [b]
Aroma	7,4±1,6[a]	7,6±1,4[a]
Cor da casca	7,1±1,7[a]	7,6±1,6[b]
Cor do miolo	7,6±1,8[a]	7,8±1,4[b]
Sabor	5,9±2,2[a]	7,4±1,7[b]
Textura	6,5±2,0[a]	7,5±1,7[b]
Gosto residual	5,8±2,1[a]	7,1±1,8[b]
Intenção de consumo[3]	3,9±1,8[a]	5,2±1,6[b]
Intenção de compra[4]	3,2±1,4[a]	4,1±1,3[b]

[1]Resultados expressos como média±desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa (teste t pareado, p<0,05). [2]Escala de nove pontos (1 = desgostei extremamente; 5 = não gostei, nem desgostei; 9 = gostei extremamente). [3]Escala de sete pontos (1 = nunca comeria; 4 = comeria ocasionalmente; 7 = comeria sempre). [4]Escala de cinco pontos (1 = certamente não compraria; 3 = talvez compraria, talvez não compraria; 5 = certamente compraria).

4. Conclusão

As antocianinas cianidina-3-*O*-glicosídeo e delfinidina-3-*O*-glicosídeo foram os principais compostos fenólicos identificados na farinha de jabuticaba, porém, durante o armazenamento os teores das antocianinas reduziram progressivamente, assim como o teor total de compostos fenólicos. A cor instrumental também modificou durante o armazenamento, o que pode ser atribuído à perda das antocianinas. Porém, ao final de 90 dias de estocagem, ainda foi possível identificar que a farinha de jabuticaba é fonte de compostos fenólicos, em especial os ácidos elágico e gálico.

A aplicação da farinha de jabuticaba em pão de forma integral demonstrou ser viável para o enriquecimento deste alimento do ponto de vista bioativo, visto que foi

observado um aumento significativo dos teores de compostos fenólicos totais dos pães adicionados de farinha de jabuticaba. O processo de cocção promoveu o aumento dos teores de compostos fenólicos na fração solúvel no pão de jabuticaba elaborado. Entretanto, houve um aumento maior na fração solúvel deste produto devido a redução intensa das antocianinas na fração solúvel, que são extremamente sensíveis a altas temperaturas.

A farinha de jabuticaba é um produto de possivel aplicação em produtos de panificaão, em especial, no pão, que possui capacidade antioxidante e é rico em compostos fenólicos. Entretanto, é necessário o desenvolvimento e a utilização de outros métodos de armazenamento, como o congelamento, que ainda não foram testados, visto que hé uma baixa estabilidade dos compostos bioativos identificados.

Por fim, o pão de jabuticaba foi razoavelmente bem aceito do ponto de vista sensorial e apresentou maior teor de fibras, capacidade antioxidante e compostos fenólicos, apesar da perda importante dos teores de antocianinas após a cocção.

CAPITULO 2

EFEITO DO BIOPROCESSAMENTO EM PÃES ADICIONADOS DE FARINHA DE JABUTICABA (*MYRCIARIA JABOTICABA)*

Resumo

O pão é obtido pela cocção de uma massa, fermentada ou não, preparada com farinha de trigo e/ou outras farinhas que contenham proteínas formadoras de glúten e água, podendo conter outros ingredientes. Atualmente, as frutas e seus subprodutos são utilizados para obtenção de farinha e estas possuem potencial aplicação em produtos de panificação. A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) é, normalmente, consumida fresca, porém começa a fermentar cerca de 3 a 4 dias após a sua colheita. O bioprocessamento de alimentos é caracterizado pela transformação de matérias-primas em produtos próprios para o consumo e quando aplicado em alimentos, especialmente em produtos de panificação, promove a melhora das características tecnológicas. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do bioprocessamento enzimático sobre as características tecnológicas e sobre os teores de compostos fenólicos (CF) em pães adicionados de farinha de jabuticaba (FJ). Parâmetros físico-químicos, capacidade antioxidante (CA) e teores de CF analisados por CLAE foram avaliados nos pães (controle com 100% de farinha de trigo integral – PI; controle com substituição de 10% da farinha de trigo pela FJ – PJ; bioprocessado com 100% de farinha de trigo integral – PIB; e bioprocessado com substituição de 10% da farinha de trigo pela FJ – PJB). A enzima utilizada no bioprocessamento foi a xilanase. O bioprocessamento promoveu maior volume e menor densidade no pão integral e o contrário foi observado para o pão elaborado com a farinha de jabuticaba. O bioprocessamento não alterou o pH dos pães, mas deixou os pães bioprocessados mais escuros (parâmetro L^* se reduziu). Na fração solúvel, a CA não alterou no pão integral após a adição enzimática, no entanto, o bioprocessamento promoveu o aumento da CA no pão de jabuticaba. O mesmo comportamento foi observado para a distribuição dos CF. A qualidade microbiológica e sensorial dos pães foi considerada adequada. Portanto, acredita-se ser um produto em potencial rico em CF solúveis com possíveis benefícios a saúde.

1. Introdução

Por definição, pão é o produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa, fermentada ou não, preparada com farinha de trigo e/ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água, podendo conter outros ingredientes. Já o pão integral é definido como produto preparado, obrigatoriamente, com farinha de trigo e farinha de trigo integral e/ou fibra de trigo e/ou farelo de trigo. A maioria dos consumidores prefere os produtos elaborados com farinha de trigo refinada do que os com grãos integrais, uma vez que as propriedades de textura e sabor de seus farelos são consideradas menos atraentes. Logo, um dos principais desafios da indústria de alimentos é melhorar as características sensoriais dos produtos elaborados com farinha de trigo integral com o intuito de estimular o consumo desses produtos (CODA et al., 2015). Ademais, na farinha de trigo integral, os compostos fenólicos estão presentes principalmente na forma insolúvel, associados a componentes da parede celular (ADOM et al., 2003; DINELLI et al., 2011; OKARTER et al., 2010). No entanto, para promover os efeitos benéficos à saúde, os compostos fenólicos devem estar solúveis e disponíveis para absorção no organismo humano, o que depende primeiramente da forma química na qual ele se encontra no alimento (PODSEDEK et al., 2014; WANG et al., 2014).

As frutas chamadas de *berries* são comercialmente cultivadas e comumente consumidas em suas formas frescas e processadas, como as *blackberries*, *blueberries*, morango, framboesa, camu camu, jabuticaba, entre outras (DE SOUZA et al., 2014). A jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O.Berg. [Myrtaceae]) é proveniente de uma pequena árvore nativa da região de Minas Gerais, no sudeste do Brasil, que gera frutas semelhantes às uvas. Tem uma pele espessa, roxa e adstringente que cobre uma polpa doce, branca e gelatinosa. Comum nos mercados brasileiros, este fruto é, em grande parte, consumido fresco. Porém, podem começar a fermentar de 3 a 4 dias após a colheita, de modo que muitas vezes são usadas para fazer confeitos, tortas, vinhos fortes e licores (REYNERTSON et al., 2006).

Atualmente, as frutas e seus subprodutos, inclusive a jabuticaba, também têm sido utilizados para a obtenção de farinhas (NUNES et al., 2016; SAVLAK et al., 2016). Estas possuem potencial aplicação em produtos de panificação na substituição parcial da farinha de trigo, com o intuito de enriquecê-los do ponto de vista bioativo

(UGWUONA et al., 2013; COELHO et al., 2017). Os produtos de panificação são consumidos diariamente em grande quantidade pela população mundial, constituindo uma das principais fontes energéticas para quem os adquire (KTENIOUDAKI and GALLAGHER, 2012).

O bioprocessamento de alimentos é caracterizado pela transformação de matérias-primas alimentares, através de métodos físicos e/ou químicos, em produtos próprios para o consumo. Atualmente, sabe-se que o bioprocessamento promove modificações estruturais na matriz alimentar e, portanto, podem ser empregados pela indústria de alimentos com o intuito de facilitar a liberação dos compostos fenólicos insolúveis das estruturas celulares e melhorar as características sensoriais dos produtos (WANG et al., 2014). De maneira geral, refere-se à utilização de enzimas e/ou microrganismos capazes de promover modificações desejáveis na matriz alimentar, como, por exemplo, o aumento da liberação dos compostos fenólicos insolúveis das estruturas celulares (CODA et al., 2015).

Os ácidos fenólicos existem em estruturas esterificadas a oligo ou polissacarídeos e formam pontes entre as cadeias de polímero no grão. A estrutura em forma livre ou vinculada afetaria a sua biodisponibilidade e consequentes efeitos fisiológicos. Foi relatado que o bioprocessamento dos cereais afeta positivamente o teor de compostos fenólicos e, possivelmente, suas propriedades bioativas e benefícios para a saúde (ABDEL-AAL & RABALSKI, 2013).

De fato, os estudos comprovam a eficácia do bioprocessamento de alimentos em melhorar as características sensoriais dos produtos de panificação integrais. Esta propriedade se caracteriza pela maior digestibilidade proteica, alteração da estrutura da cadeia de glúten, aumento do volume e da viscosidade pós-cocção do produto e transformação de componentes do trigo, como os arabinoxilanos, em formas mais solúveis (KTENIOUDAKI and GALLAGHER, 2012; ABDEL-AAL & RABALSKI, 2013; DZIKI et al., 2014; CODA et al., 2015). ANSON et al. (2011) e DELCOUR et al. (2012) relataram a melhora da bioacessibilidade *in vitro* e da biodisponibilidade e bioatividade *in vivo* dos compostos fitoquímicos presentes em pães bioprocessados.

Portanto, produtos integrais e adicionados de cascas e sementes de frutas, ricos em taninos, tendem a ser endurecidos e ter sabor amargo, o que pode prejudicar sua aceitação. A associação da panificação com técnicas de bioprocessamento enzimático podem melhorar as características sensoriais e aumentar a aceitabilidade do produto. Com isso, além de criar um novo produto em potencial no mercado com propriedades

fisiológicas benéficas à saúde, a utilização do bioprocessamento enzimático de alimentos como meio tecnológico pode aumentar os teores de compostos fenólicos solúveis no pão integral adicionado de farinha de jabuticaba. Logo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do bioprocessamento enzimático sobre as características tecnológicas e sobre os teores de compostos fenólicos em pães adicionados de farinha de jabuticaba.

2. Material e métodos

2.1. Material, solventes, reagentes e padrões

Fluoresceína, 2,4,6-Tris(2-piridil)-S-triazina (TPTZ), ácido (±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox), reagente de Folin & Ciocalteu e cloreto férrico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Sulfato de ferro (II) foi adquirido da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Todos os solventes foram grau CLAE e foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA). Água grau CLAE (sistema Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) foi utilizada em todos os experimentos. Os padrões comerciais de antocianinas e não antocianinas foram adquiridos, respectivamente, da Indofine Chemical Co. (Hillsborough, NJ, EUA) e Sigma-Aldrich Chemical Co. Filtro de seringa de PTFE hidrófilo (13 mm x 0,45 μm) foi adquirido da Analitica (São Paulo, SP, Brasil).

2.2. Enzimas

Foram utilizados dois extratos enzimáticos provenientes de empresas que comercializam enzimas para aplicação em alimentos, sendo eles: Panzyn® e Celumax®, doadas pela Prozyn (São Paulo, Brasil). Também foi utilizado um extrato bruto, obtido a partir da fermentação em estado sólido da semente do cacau utilizado na fabricação de chocolate, proveniente da fábrica CEPLAC, localizada ao sul da Bahia, e que foi doado pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM, Instituto de Química/UFRJ).

A Panzyn® e Celumax® possuem atividade enzimática amilolítica e celulolítica, respectivamente, e o laboratório afirma que o fermentado de cacau possui atividade xilanolítica. Porém, um extrato enzimático pode possuir mais de uma atividade enzimática. Portanto, foi necessário avaliar as atividades enzimáticas (amilolítica,

celulolítica e xilanolítica) em todos os preparados utilizados (descrita no item 2.3.) para avaliar a verdadeira ação dos mesmos sob as amostras de pães estudadas.

2.2.1. Extração

Os extratos enzimáticos comerciais já chegaram preparados, não necessitando de extração para a sua análise. Estes extratos vieram secos após liofilização na forma de pó sólida.

O fermentado de cacau obtido através do processamento das sementes do fruto do cacau para fabricação de chocolate (proveniente da fábrica CEPLAC, sul da Bahia) foi utilizado como fonte de xilanase. A extração foi realizada sob um farelo de cacau escuro, úmido, sólido e previamente fermentado utilizado anteriormente para a produção do chocolate. Sobre este foi adicionada água destilada, na proporção 5 mL/g, sob agitação rotatório a 35 °C e 200 rpm por 20 minutos. Em seguida, o farelo de cacau foi prensado manualmente, resultando no extrato enzimático bruto e líquido. Uma alíquota (1 mL) desse extrato foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. A atividade enzimática foi medida utilizando este sobrenadante.

2.3 Atividades enzimáticas

As três análises de atividade enzimática (amilolítica, celulolítica e xilanolítica) foram relizadas nos três extratos enzimáticos.

A atividade da xinalase produzida através do fermentado do cacau, foi adaptada de um protocolo do LaBiM onde, xilanase foi quantificada a partir da concentração de açúcar redutor no meio, uma vez que a enzima catalisa a conversão de xilana em xilose. Para isto, utilizou-se uma solução de xilana Birchwood (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão universal (BRITTON & ROBINSON, 1931) (pH=5) 1% (p/v) como substrato. A reação se deu entre 10 µL de extrato enzimático e 90 µL da solução de xilana durante 5 minutos a 40°C. Os açúcares redutores produzidos pela reação foram medidos pelo método do DNS, sendo a absorbância medida a 540 nm. A atividade de xilanase foi determinada de acordo com MILLER (1959) e a curva padrão foi construída a partir de uma solução de xilose 1 g/L, utilizando diferentes diluições (MILLER, 1959).

A atividade enzimática amilolítica foi determinada pelo método sacarificante que se baseia na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959). A um tubo de ensaio

de 25 mL com tampa, foram adicionados 200 µL de tampão citrato-fosfato (50 mmol/mL; pH 6,8), 100 µL de amostra a ser testada e 300 µL de solução de amido (1%). A mistura foi incubada a 40 ºC por 30 minutos e, posteriormente, 1,5 mL de reagente ácido dinitrosalicilico, caracterizado por: 10 g/mL ácido dinitrosalicilico (DNS), 100 µL) de NaOH (2 mmol/mL -1), 300 g/mL de tartarato de sódio e potássio; foi adicionado. A mistura foi fervida (105 ºC) por 5 minutos em banho-maria e a absorbância determinada a 550 nm. A quantidade de açucares redutores formados foi calculada de acordo com uma curva padrão de glicose.

A atividade enzimática celulolítica foi avaliada baseada no método de GHOSE (1987). O experimento foi realizado em triplicata. Tubos de reação foram preparados adicionando 1 mL de tampão citrato, uma fita de papel de filtro Whatman nº 1, 1x6cm, e 0,5 mL da amostra a ser testada. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 50 °C, por 60 minutos. Passado o tempo de reação, foi adicionado 3 mL do reagente DNS. Todos os tubos foram fervidos (105 ºC) por 5 minutos, resfriados em água gelada e adicionou-se 20 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro à 540 nm. A atividade celulásica foi quantificada a partir de uma curva padrão de glicose diluída juntamente ao tampão citrato também diluído.

Os principais critérios de escolha de extrato enzimático a se utilizar nos pães foram: quais atividades enzimáticas presentes no extrato, custo/doação, volume e densidade pós cocção, altura do produto e, liberação de compostos fenólicos da fração insolúvel para a fração solúvel.

2.4. Elaboração dos pães

A farinha do subproduto de jabuticaba foi obtida conforme descrito no item 3.1.1 do Capítulo 1. O pão integral controle (PI) foi preparado em triplicata de acordo com CASTELO-BRANCO et al. (2016) com modificações, em uma máquina de pão automática em condições pré-estabelecidas pelo fabricante (Panificadora multi-painel, Britânia). Os ingredientes foram adicionados na seguinte ordem: 315 mL de água, 12 g de açúcar mascavo, 4,5 g de sal (NaCl), 22,5 mL de azeite extra virgem, 405 g de farinha de trigo integral, 45 g de farelo de trigo e 4,5 g de fermento seco (*Saccharomyces cerevisiae*). O pão de jabuticaba controle (PJ) foi preparado seguindo as etapas de preparação de PI, com substituição parcial da farinha de trigo por 10% da farinha de jabuticaba. O pão integral bioprocessado (PIB) foi preparado seguindo os

passos de preparação de PI, com substituição de 85 mL da água pelo extrato fermentado de cacau. Para o pão de jabuticaba bioprocessado (PJB) a mesma alteração foi empregada. Os pães foram arrefecidos à temperatura ambiente, cortados em pequenas fatias, moídos em um moinho laboratorial (A11, IKA® Werke, Staufen, Alemanha), selados a vácuo e armazenados a -20 ° C até as análises. Previamente a analise, foi feita uma pesagem de cada uma das triplcatas separadamente e estas foram analisadas separadas. Todos os ingredientes necessários para a fabricação dos pães foram adquiridos em mercados locais na cidade do Rio de Janeiro, Brasil.

2.5. Análises físico-químicas

O valor de pH foi determinado nos quatro pães (PI, PJ, PIB, PJB) conforme descrito no Manual de Métodos Físico-Químicos de Análise de Alimentos do Instituto de Adolfo Lutz (2008).

As coordenadas colorimétricas foram mensuradas em equipamento Konica Minolta CR-400 (Konica Minolta, Tokyo, Japão) em todos os pães. O equipamento foi calibrado com iluminante D65 (2° ângulo observador) usando uma placa branca padrão. Foram avaliados, através do CIELab, os parâmetros: *L** (brilho ou luminosidade; 0 = preto, 100 = branco), *a** (-*a**, verde; +a*, vermelho) e *b** (-*b**, azul; +*b**, amarelo).

O volume e a densidade dos pães foram determinados de acordo com metodologia descrita pela *American Association of Cereal Chemistry* (AACC, 2001).

O rendimento foi determinado segundo a seguinte equação:

Rendimento (%) = peso final do pão / peso inicial massa crua X 100

2.6. Avaliação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada, em triplicata, baseada nos métodos espectrofotométricos FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) e Folin-Ciocalteau. Para realização dos ensaios, as amostras foram extraídas da mesma forma que as amostras extraídas e analisadas em CLAE.

2.6.1 Ferric Reduction Antioxidant Power (FRAP)

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia adaptada de BENZIE & STRAIN (1996). As soluções estoque de tampão de acetato de sódio 300 mM (pH 3,6), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) 10mM e cloreto de ferro 20 mM foram utilizadas para o preparo do reagente de FRAP, nas proporções de 10:1:1, respectivamente. O reagente de FRAP foi mantido à temperatura de 37 °C até o momento de sua utilização. Foram pipetados 20µL das diferentes concentrações do padrão e dos extratos a 180 µL da solução de FRAP em uma placa de 96 poços. A placa foi mantida a 37 °C por 6 minutos em ambiente escuro e, após esse período a leitura foi realizada espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Anthos Zenyth 200st microplate reader) a 593 nm. Os resultados foram expressos em µmol Fe^{+2}/100 g de farinha, em base seca. Cada extrato foi analisado em duplicata.

2.6.2. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

O ensaio de TEAC foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de RE et al. (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 ($K_2S_2O_8$) 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, à 720 nm, fosse de 0,70±0,02. Dez microlitros do extrato foram pipetados em placa de 96 poços e adicionados 190 µL da solução diluída do radical ABTS. A leitura da absorbância foi realizada a 720 nm em espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Anthos zenyth 200st microplate reader) 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/100 g de farinha, em base seca. Cada extrato foi analisado em duplicata.

2.6.3. *Folin-Ciocalteu*

O ensaio de *Folin-Ciocalteu* foi realizado 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-Ciocalteu* e 300 µL de solução de carbonato de sódio

(Na_2CO_3) 20%. Após a homogeneização, a mistura foi mantida a 40 ºC por 30 minutos. A absorbância da solução foi medida a 765 nm, usando o espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Anthos Zenyth 200st microplate reader) e a quantificação foi realizada pela curva padrão de ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/ 100 g de farinha, em base seca (bs). Cada extrato foi analisado em duplicata.

2.7. Compostos fenólicos solúveis e insolúveis por CLAE-DAD

2.7.1. Extração

A extração de compostos fenólicos solúveis e insolúveis nos pães integral e de jabuticaba, controle e bioprocessados foi realizada em duplicata, conforme descrito por CASTELO-BRANCO et al. (2016), com adaptações. Para compostos fenólicos solúveis, extraiu-se 2 g de cada amostra durante 5 min com 10 mL de solução etanol:água:HCl (80:19:1, *v*/*v*/*v*) e centrifugou-se (2500 x *g*, 5 min, 10 ºC, Sorvall ST 16R, Thermo ScientificTM, Osterode, Alemanha). O sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi novamente extraído. Os sobrenadantes foram combinados, o solvente foi evaporado em rotaevaporador (IKA RV 10 D control auto, Campinas, SP, Brasil), o resíduo seco foi reconstituído em 10 mL de água e armazenado a -20 ºC até a análise.

Para análise de compostos fenólicos insolúveis, o resíduo obtido após a etapa anterior foi submetido às hidrólises alcalina e ácida, como se segue. Para hidrólise alcalina, o resíduo foi incubado durante 16 h, no escuro, com 12 mL de água e 5 mL de NaOH (10 M) à temperatura ambiente com agitação orbital (Biomixer VDRL Kline com temporizador TS 2000A). Posteriormente, o pH foi ajustado para 2,0 com HCl concentrado e a mistura foi extraída com 10 mL de acetato de etila, centrifugada (2500 x *g*, 5 min, 10 ºC) e, após aspirar o sobrenadante, o resíduo foi re-extraído duas vezes com acetato de etila. Os sobrenadantes foram combinados, o solvente foi evaporado em rotaevaporador, o resíduo seco foi reconstituído em 10 mL de solução metanol:água (80:20, *v*/*v*) e armazenado a -20 ºC até o momento da análise.

Para a hidrólise ácida, o resíduo da hidrólise alcalina foi incubado com 2,5 mL de HC1 concentrado a 85 ºC durante 30 min. Em seguida, o mesmo foi submetido à extração com acetato de etila conforme descrito anteriormente para a etapa de hidrólise alcalina.

Os resultados obtidos a partir da análise dos extratos obtidos após as hidrólises alcalina e ácida foram combinados para representar o teor de compostos fenólicos insolúveis. O teor total de compostos fenólicos é representado pela soma do teor de compostos fenólicos solúveis e insolúveis.

Todos os extratos foram filtrados em filtros de membrana de éster de celulose de 0,45 µm (Analitica, Brasil) antes da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Condições cromatográficas

O sistema de cromatografia líquida (Shimadzu®, Japão) incluiu bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos modelo SDP-MD20A, auto injetor SIL-20AHT, degaseficador DGU-20A5 gerenciado por um controlador CBM-20A, conectado diretamente a um computador equipado com Software LabSolutions (Shimadzu Corporation®, versão 5.82, 2015).

A separação cromatográfica de compostos fenólicos não antocianinas foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa (C18, 5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Phenomenex®). A fase móvel consistiu em gradiente de solução de ácido fórmico aquoso 1% (eluente A) e acetonitrila (eluente B), com fluxo de 1,0 mL/min. Antes da injeção, a coluna foi equilibrada com 18% de eluente B. Após a injeção da amostra, essa proporção amentou para 20% de B em 1 min, 43% de B em 18 min e 85% de em 23 min, sendo mantida constante até 30 min. Entre as injeções, intervalos de 10 min 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 separação cromatográfica das antocianinas foi realizada usando uma coluna de fase reversa (C18, 5 µm, 150 mm × 4,6 mm, Phenomenex®). A fase móvel consistiu em um gradiente de solução de ácido fórmico aquoso 1% (eluente A) e acetonitrila (eluente B), com fluxo de 1,0 mL/min. Após a injeção da amostra, essa proporção amentou para 20% de B em 1 min, 43% de B em 18 min e 85% de em 23 min, sendo mantida constante até 30 minutos. Entre as injeções, intervalos de 10 minutos foram utilizados para re-equilibrar a coluna com 23% do eluente B. As antocianinas foram monitoradas por detector DAD a 530 nm.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação com o tempo de retenção e o espectro de absorção do padrão respectivo e a quantificação foi realizada por calibração externa. Os dados foram adquiridos pelo *Software* LabSolutions

(Shimadzu Corporation®, versão 5.82, 2015).

Para a confirmação dos compostos obtidos nos cromatogramas, as amostras foram analisadas por espectrometria de massa (CLAE-DAD-EM, Shimadzu®). Para tal, foi realizada extração de fase sólida, onde cartuchos SPE comerciais C18 (Strata-X) foram utilizados para receber as amostras que já tinham passado pela extração descrita anteriormente. A coluna foi condicionada com 3 mL de metanol, seguida de 3mL de água milli-Q utilizando-se um vacuum manifold de 12 posições da marca Phenomenex®, a vazão foi controlada utilizando-se bomba a vácuo (Quimis®, Diadema, São Paulo). Após a etapa de condicionamento em cada um dos cartuchos foi feita a aplicação de 0,5 mL da amostra. Após a aplicação das amostras foi feita a eluição dos compostos de interesse utilizando-se 3 mL de uma mistura constituída por metanol e água milli-Q (5:95, *v*:*v*) sob vácuo, após a amostra já ter sido filtrada. Ao final, a amostra foi coletada em tubos de ensaio e o solvente evaporado em fluxo de nitrogênio. Antes das análises por CLAE-DAD-EM o resíduo seco foi reconstituído com 1 mL da fase móvel B.

2.8. Análise sensorial

Todos os pães foram analisados para pesquisa de coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella sp* (APHA, 2001), de acordo com os padrões da RDC nº 12 (ANVISA). As análises foram realizadas por uma empresa terceirizada em no máximo 24h após o preparo das mesmas.

Os quatro pães foram avaliados por 100 consumidores não treinados no dia seguinte ao preparo dos mesmos. Incialmente os participantes responderam a um questionário para caracterização do perfil dos provadores (**Anexo 1**).

A aceitação do produto foi avaliada por intermédio de uma escala hedônica de nove pontos, tendo como pontos de âncora superior e inferior as expressões “gostei extremamente” e “desgostei extremamente”, respectivamente, e como ponto central “não gostei nem desgostei”. Os parâmetros testados foram aspecto global, cor da casca, cor do miolo, textura, sabor, sabor residual e aroma.

A intenção de consumo foi mensurada por meio de uma escala hedônica de 7 pontos, tendo como ponto de âncora superior e inferior as expressões “comeria sempre” e “nunca comeria”, respectivamente, e como ponto central “comeria ocasionalmente”.

A intenção de compra foi avaliada com o emprego de escala hedônica de cinco pontos, tendo como pontos de âncora superior e inferior as expressões “certamente compraria” e “certamente não compraria”, respectivamente, e como ponto central “talvez compraria, talvez não compraria” (MEILGAARD et al., 2007). Todos os questionários encontram-se detalhados nos **Anexos 2 e 3**.

As análises foram realizadas em laboratório livre de outros odores e cores fortes. As amostras foram preparadas em recipientes idênticos, codificadas com números aleatórios de três dígitos e cada amostra recebeu um número diferente. As amostras (pão integral e pão de jabuticaba) foram oferecidas ao mesmo tempo, juntamente a um copo de água. As porções foram oferecidas com casca e miolo e seu tamanho foi retangular com 2 cm de largura e 3 cm de comprimento.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 4**). O projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ (parecer n° 1.067.045).

2.9. Análises Estatísticas

Os resultados da análise sensorial dos pães e as análises para os testes das enzimas (densidade, volume e compostos fenólicos por CLAE) foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA-*one way*), seguida de pós-teste de Tukey ou seguido de pós teste de Dunnet’s.

O efeito da substituição parcial da farinha de trigo integral pela farinha de jabuticaba nos pães em relação à capacidade antioxidante e teores de compostos fenólicos e o efeito do bioprocessamento foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA-*two way*), seguida de pós-teste de Bonferroni.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software Graph PadPrism. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização das enzimas

Inicialmente, para a escolha da enzima a ser utilizada no bioprocessamento foi realizada pesquisa bibliográfica (DINELLI et al., 2009; VERMA et al., 2009; WANG et

al., 2013) e consulta as empresas que comercializam enzimas para aplicação em alimentos. Duas enzimas comerciais: Panzyn® e Celumax® doadas pela Prozyn (São Paulo, Brasil) e um extrato bruto, obtido a partir da fermentação em estado sólido do resíduo do cacau, doado pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM, Instituto de Química/UFRJ) foram utilizadas.

As atividades celulolítica, amilolítica e xilanolítica foram avaliadas em todos os preparados enzimáticos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Atividade celulolítica, amilolítica e xilanolítica dos preparados enzimáticos.

Preparado enzimático	**Atividade celulolítica**	**Atividade amilolítica**	**Atividade xilanolítica**
Panzyn®	0,0 U/g	9124,8 U/g	17,2 U/g
Celumax®	872,6 U/g	0,0 U/g	182,3 U/g
Preparado enzimático de cacau	2,87 U/mL	0,0 U/mL	11,8 U/mL

Tabela 2. Concentrações e atividades das enzimas empregadas para elaboração do pão integral bioprocessado.

Enzima	Concentração da enzima[1]	Atividade enzimática		
		Celulolítica (U/g)	Amilolítica (U/g)	Xilanolítica (U/mL)
Celumax®	0,003%	13,1	ND[2]	2,7
	0,02%	65,5	ND[2]	13,7
Panzin®	0,0013%	ND[2]	54,8	0,1
	0,0026%	ND[2]	109,5	0,2
	0,0375%	ND[2]	419,7	0,8
	0,1%	ND[2]	4206,5	7,9
Celumax® e Panzin®	0,02% e 0,0026%	65,5	109,5	13,9
Preparado enzimático de cacau	0,0425%	1,0	0	4,0
	0,53%	12,1	0	50,0
	2,1%	48,5	0	200,0
	10,6%	242,4	0	1000,0

[1] Celumax®: valores expressos em g/100 g do peso da massa crua; Panzin®: valores expressos em g/100 g de farinha de trigo; Preparado enzimático de cacau: valores expressos em mL/100 g do peso da massa. [2] ND: Não detectado.

Os preparados enzimáticos foram então testados na formulação de pão integral visando avaliar o efeito sobre o volume e a densidade. As concentrações utilizadas de cada enzima foram baseadas nas sugestões da empresa, sendo para a Panzyn® (0,65 g a 1,3 g/100 g de farinha) e para a Celumax® (0,1% a 0,5% em relação ao peso da massa crua). Para o preparado enzimático de cacau fez-se uma busca bibliográfica e foram

encontrados valores de utilização de 5 U/mL a 5000 U/mL em relação a concentração de xilanase em produtos de panificação (patente nº PI0801816-2 A2). As combinações utilizadas estão apresentadas na **Tabela 2**.

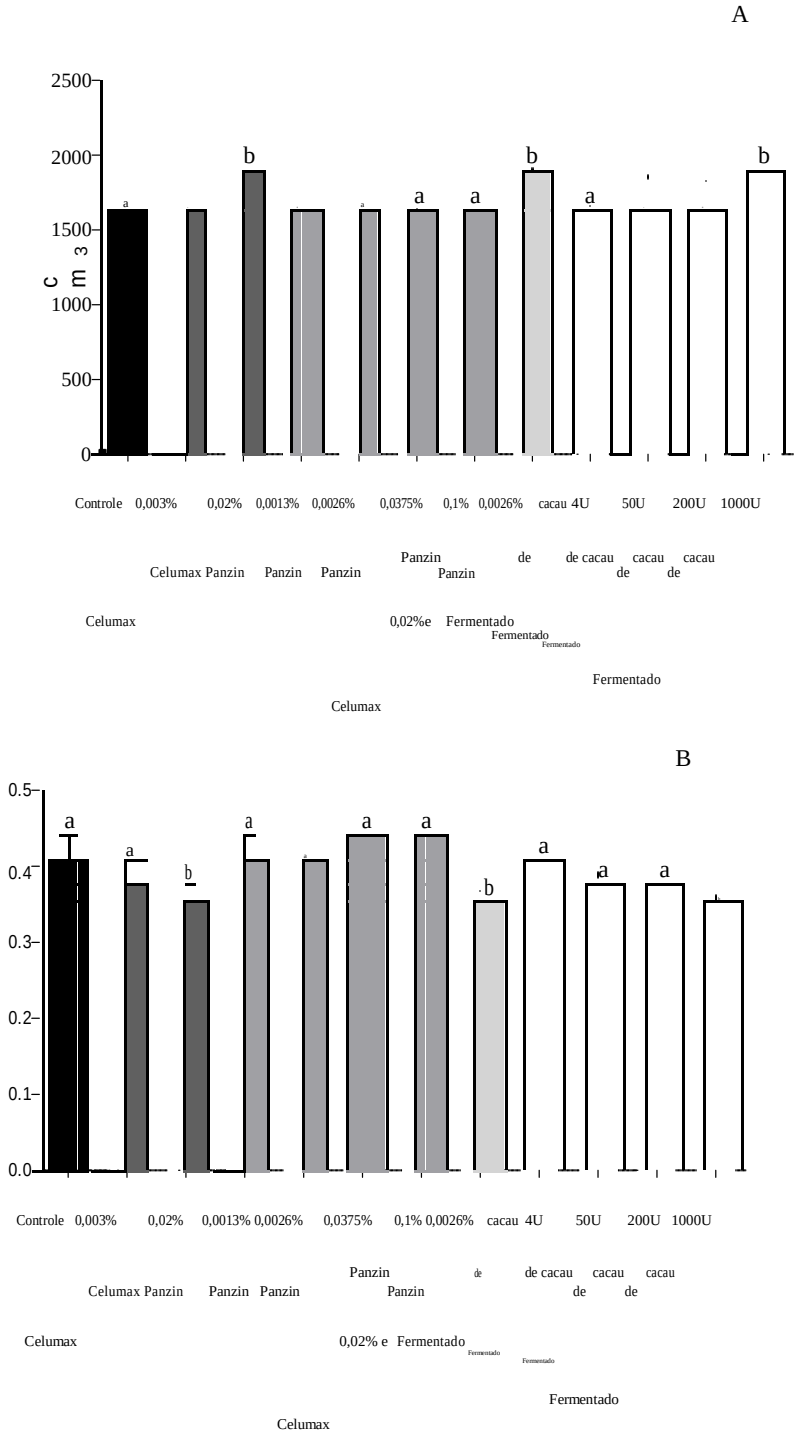

Figura 1. Volume (**A**) e densidade (**B**) dos pães bioprocessados com diferentes concentrações dos preparados enzimáticos. Resultados expressos como média ±DP de triplicatas. Letras diferentes indicam diferença significativa em relação ao controle (One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet's, $p<0,05$).

O efeito do bioprocessamento sobre o volume e a densidade dos pães está apresentado na **Figura 1**.

A enzima Panzyn® não foi utilizada nos próximos experimentos, visto que mesmo aumentando quase 30 vezes sua concentração, não foram observadas diferenças significativas no volume e na densidade dos pães em relação ao pão controle (**Figura 1**). A combinação Panzyn® e Celumax® não foi continuada nos testes seguintes visto que a Celumax® por si só obtinha o mesmo efeito do que a combinação como um todo, podendo-se, mais uma vez, descartar a utilização da Panzin®.

O volume e a densidade dos pães bioprocessados com a Celumax® (0,02%) e com o fermentado de cacau (1000 U/mL) foram comparados entre si (**Figura 2**), visto que se caracterizaram os únicos que obtiveram diferença significativa em relação ao pão controle quando avaliados sob o ponto de vista do volume e da densidade (**Figura 1**). Porém, na **Figura 2**, ao comparar estas amostras entre si e o controle, pode-se observar que não houve diferença significativa.

A fim de avaliar o efeito do bioprocessamento sobre o teor de compostos fenólicos, especificamente o ácido ferúlico, por ser o principal composto fenólico da farinha de trigo (ANSON et al., 2009; HEMERY et al., 2010; NORDLOUND et al., 2013), as amostras foram analisadas por CLAE (**Tabela 3**). Observou-se que o pão elaborado com o preparado enzimático de cacau apresentou maior teor de ácido ferúlico na forma solúvel, sendo este, respectivamente, 57% e 39% quando comparado ao pão controle e com pão elaborado com a Celumax® (**Tabela 3**). Quando um composto fenólico se encontra na sua forma solúvel ele também está mais biodisponivel no organismo, o que é desejável. Portanto, o preparado enzimático de cacau a 1000 U/mL foi escolhido para ser utilizado. Também pode-se observar que o a quantidade total de ácido ferúlico se reduziu no pão escolhido. Isso pode ter ocorrido como consequência da ação do extrato enzimático sob a estrutura do ácido ferúlico, que pode tê-lo clivado em derivados de cadeia menor, como o ácido *p*-cumárico.

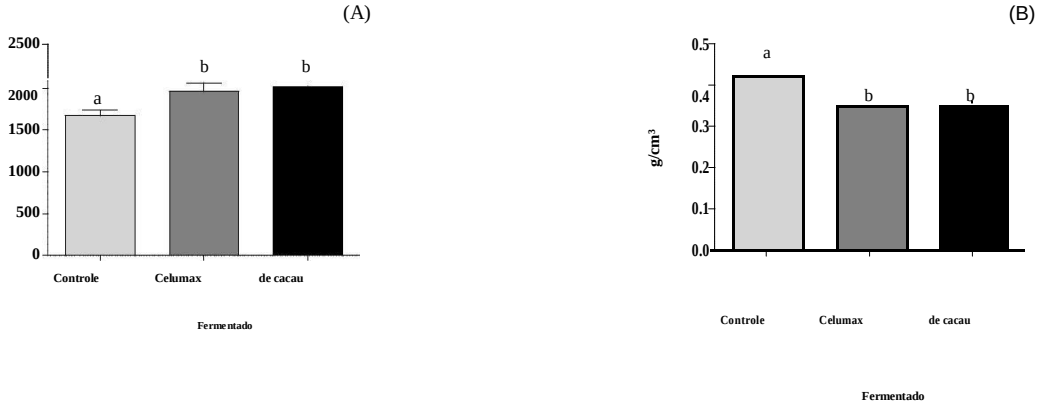

Figura 2. Volume (**A**) e densidade (**B**) dos pães adicionados de diferentes enzimas em comparação ao pão controle (sem adição de enzima) expressos em cm³ e g/cm³, respectivamente. Resultados expressos como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa. (One-way Anova, seguido de pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Tabela 3. Teor de ácido ferúlico (mg/100g, bs) nos pães integrais controle e adicionados de enzimas[1].

Composto	Extrato	Pão integral controle	Pão integral celumax® (0,02%)	Pão integral fermentado de cacau (1.000 U)
Ácido ferúlico	*fração solúvel*	1,9±0,1[a]	2,7±0,0[b]	4,4±0,0[c]
Ácido ferúlico	*fração ácida*	6,3±0,2[a]	7,8±0,3[b]	6,1±0,2[a]
Ácido ferúlico	*fração alcalina*	115,3±5,4[a]	114,6±1,6 [a]	97,0±1,7[b]
Total		**123,6±5,6[a]**	**125,1±2,3[a]**	**107,5±1,6[b]**

[1]Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias (One-way Anova, seguido de pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

3.2. Parâmetros físico-químicos

O volume e a densidade das quatro amostras (PI, PJ, PIB e PJB) foram avaliados (**Figura 3**). Os pães elaborados com a adição de farinha de jabuticaba apresentaram menor volume e maior densidade, o que não é adequado do ponto de vista tecnológico. Para os pães integrais sem a farinha de jabuticaba, o bioprocessamento aumentou o volume e reduziu a densidade, parâmetros que tendem a melhorar os aspectos sensoriais do produto. Ressalta-se que esse efeito já foi previamente relatado na literatura por outros autores (CODA et al., 2015; KATINA et al., 2012; NORDLUND et al., 2013). No entanto, para o pão de jabuticaba, o bioprocessamento não demonstrou melhora

significativa nos aspectos de volume e de densidade (**Figura 3**). O teste realizado para se escolher o melhor extrato enzimático a ser utilizado no presente trabalho foi realizado apenas com no pão integral. Portanto, talvez seja necessário adicionar maiores quantidades de enzima para obter o mesmo efeito no pão adicionado de farinha de jabuticaba, visto que, provavelmente, a jabuticaba inibe o efeito da xilanase. As endo-xilanases bacterianas apresentam pesos moleculares na faixa de 15 kDa a 85 kDa, geralmente são mais ativas em meios levemente alcalinos ou neutros (pH 5,0 a 8,0) e em temperaturas mais elevadas (50 ºC a 90 ºC) (ZHENG, 2000). Sabe-se que a farinha de jabuticaba é predominante ácida, apresentando pH por volta de pH 4. Logo, isso pode ter influenciado na atividade da xilanase.

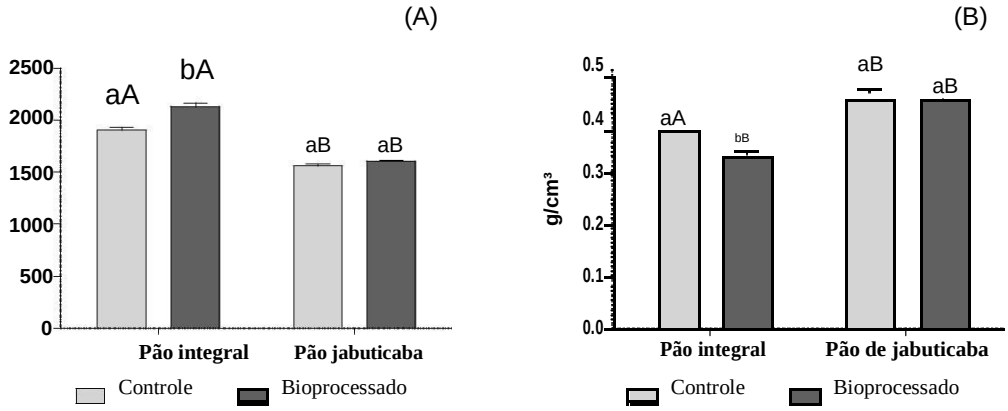

Figura 3. Volume (**A**) e densidade (**B**) dos pães elaborados. Resultados expressos como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa do bioprocessamento para um mesmo tipo de pão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa da adição da farinha de jabuticaba dentro do mesmo processamento (Two-way Anova, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$).

Alguns trabalhos apontam alternativas para melhorar a qualidade tecnológica de pães elaborados com ingredientes que não contém glúten. Entre as estratégias utilizadas destaca-se, o uso de aditivos e de agentes de texturização (hidrocolóides e emulsificantes), uso de bactérias acido-láticas, processamento por alta pressão da massa, pré-gelatinização do amido e uso de enzimas, como transglutaminase, glicose oxidase e protease (DELCOUR et al., 2012; ROSA-SIBAKOV et al., 2016).

Os arabiloxilanos (AX) são fibras dietéticas presentes na farinha de trigo, normalmente na forma insolúvel, porém nas formas solúveis, influenciam a qualidade da panificação, por alterar parâmetros como volume, textura e densidade. A utilização de enzimas, como a xilanase, com o objetivo de hidrolisar os AX insolúveis presentes

nos produtos de panificação, cliva as paredes das células do grão, permitindo que mais água seja absorvida pela estrutura da matriz do produto na hora da cocção (CODA et al., 2015; COURTIN & DELCOUR, 2002; MIHHALEVSKI et al., 2012).

O pão adicionado de farinha de subproduto de jabuticaba possui menor quantidade de glúten, devido à diminuição do percentual de farinha de trigo em sua formulação e, como consequência, há uma formação modificada da rede de glúten durante a cocção, podendo gerar ligações covalentes entre glutenina e gliadina com os AX, dificultando dessa forma a ação da xilanase. Sabe-se que o glúten também é responsável pela qualidade sensorial dos produtos após a cocção. Logo, quanto menor a quantidade deste nos produtos de panificação, maiores serão as alterações nos atributos de textura, a maciez e o sabor (AUTIO, 2006). Adicionalmente, a quantidade de AX reduzida é capaz de alterar a viscosidade na massa que seria benéfica ao retardar a retrogradação do amido e a perda de água precoce (COURTIN & DELCOUR, 2002).

Os pães adicionados de farinha do subproduto de jabuticaba (controle e bioprocessado) apresentaram os menores valores de pH (**Tabela 4**), o que pode ser explicado pelo baixo pH da farinha de jabuticaba, conforme demonstrado no capítulo 1 do presente trabalho. O menor pH dos pães de jabuticaba é favorável, pois favorece a estabilidade das antocianinas, além de inibir a proliferação de microrganismos. O bioprocessamento de ambos os pães, o 100% integral e o com a farinha do subproduto da jabuticaba, não influenciou no pH (**Tabela 4**). Dados sobre o efeito do bioprocessamento sobre o pH dos pães ainda são contraditórios na literatura. ARTE et al., (2015) relataram que o bioprocessamento promove a redução do pH em pão no qual se utilizou farelo de trigo, enquanto NORDLOUND et al., (2013) relataram que não houve modificação de pH no pão de centeio bioprocessado.

Os pães adicionados de farinha de jabuticaba apresentaram menor luminosidade (L^*), o que é atribuído ao fato da farinha de jabuticaba possuir coloração arroxeada e, portanto, escurece o produto (**Tabela 4**). O bioprocessamento gerou pães mais escuros (menor L^*), o que pode estar associado ao fato de ter sido utilizado um extrato enzimático de coloração amarron escura. Em relação às outras coordenadas colorimétricas, os pães de jabuticaba apresentaram-se avermelhados, quando analisado a^*, e menos amarelado, quando analisado b^*, em comparação aos pães integrais (**Tabela 4**). No pão de jabuticaba o bioprocessamento promovei uma redução das coordenadas a^*e b^*, diferentemente do que ocorreu ao se adicionar enzimas no pão integral, onde as coordenadas se mantiveram constantes (**Tabela 4**).

Tabela 4. pH e coordenadas colorimétricas dos pães integrais e de jabuticaba controles e bioprocessados[1].

	Pão integral	Pão integral	Pão de jabuticaba	Pão de jabuticaba
	Controle	**Bioprocessado**	**Controle**	**Bioprocessado**
pH	6,0±0,0 ^{aA}	5,9±0,0 ^{aA}	4,7±0,0 ^{aB}	4,9±0,0 ^{aB}
Coordenadas colorimétricas				
*L**	48,4±0,4 ^{aA}	45,5±1,9 ^{aA}	38,6±1,9 ^{aB}	33,2±0,8 ^{bB}
*a**	8,8±0,7 ^{aA}	8,7±0,5 ^{aA}	9,0±0,1 ^{aA}	7,3±0,1 ^{bB}
*b**	21,5±0,4 ^{aA}	21,1±0,2 ^{aA}	11,0±0,4 ^{aB}	9,2±0,5 ^{bB}

[1]Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa do bioprocessamento para um mesmo tipo de pão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa da adição da farinha de jabuticaba dentro do mesmo processamento (One-way Anova, seguido de pós-teste de tukey, $p<0,05$).

3.3. Perfil de compostos fenólicos

Nos pães foram identificados seis compostos fenólicos não antocianinas (ácidos ferúlico, 3,4-dihidroxibenzóico, gálico, elágico, cafeico e *p*-cumárico) e dois compostos fenólicos da classe das antocianinas (delfinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo) (**Tabela 5**). Dentre estes, apenas três compostos fenólicos (ácidos ferúlico, cafeico e *p*-cumárico) foram encontrados no PI e no PIB.

O teor total de compostos fenólicos no PI (154 mg/100 g) e no PIB (153 mg/100 g) não demonstraram diferença significativa entre si. Da mesma forma, o teor de compostos fenólicos do PJ (264 mg/100 g) foi similar ao do PJB (282 mg/100 g) (**Tabela 5**). Portanto, observa-se que o bioprocessamento não influenciou no teor total de compostos fenólicos dos pães elaborados. No entanto, a adição da farinha de jabuticaba gerou um aumento no teor destes compostos tanto nos pães controle quanto nos pães bioprocessados de aproximadamente 71%.

O composto majoritário encontrado nos pães integrais foi o ácido ferúlico na sua forma insolúvel (149,3 mg/100 g para PI e 141,3 mg/100 g para PIB). Outros trabalhos descreveram a presença predominante do ácido ferúlico na fração insolúvel de produtos de panificação (ANSON et al., 2009; HEMERY et al., 2010; NORDLOUND et al., 2013). Após o bioprocessamento ocorreu um aumento de 52% nos teores do ácido ferúlico na fração solúvel do pão integral, algo que também já foi descrito na literatura (ANSON et al., 2010; KTENIOUDAKI et al., 2015; NORDLOUND et al., 2013). Esse

aumento ocorreu, provavelmente, devido à ação da xilanase sobre os AX. Sabe-se que na estrutura dos AX existem moléculas de ácido ferúlico acopladas e com a ação de enzimas, como a xilanase, é possível convertê-los a forma solúvel (COURTIN & DELACOUR, 2002; MIHHALEVSKI et al., 2012).

Em relação às frações insolúveis dos pães integrais, o conteúdo de ácido ferúlico não obteve diferença significativa após o bioprocessamento entre PI e PIB. Porém, para os outros compostos, como o ácido cafeico e *p*-cumárico, houve uma redução de seus teores após a adição da xilanase em 24% e 32%, respectivamente. Sabe-se que o ácido ferúlico e o cafeico são derivados do *p*-cumárico, que também pode ser chamado de ácido hidroxicinâmico (MAZZONE et al., 2016). Porém, não foi encontrado nenhum desses compostos ou seus derivados na fração solúvel após o bioprocessamento. Isso pode ter ocorrido devido ao valor total da redução ocorrida pode não ter sido relevante do ponto de vista prático, visto que os teores encontrados destes compostos foram muito baixos.

Para o PJ e o PJB, na fração solúvel, o composto com o teor mais elevado é a cianidina-3-*O*-glicosídeo (17,9 mg/100 g e 14,7 mg/100 g, respectivamente), o que já era esperado, visto que esse composto é o principal na farinha de jabuticaba (dados apresentados no capítulo 1). Em seguida se encontra a definidina-3-*O*-glicosídeo (3,7 mg/100 g). Ambas as antocianinas sofreram uma redução de 18% e 12%, respectivamente, após o bioprocessamento. Tal fato provavelmente pode ser associado a ação da xilanase, que é uma enzima que é capaz de romper ligações glicosídicas (CODA et al., 2015). Juntamente a isso, pode-se compreender de onde veio parte do ácido gálico formado após o bioprocessamento do PJ em PJB, visto que a cianidina-3-*O*-glicosídeo, quando deglicosilada, gera ácido gálico (SINELA et al., 2017). Porém, a quantidade formada deste composto no PJB se mostra muito superior (25,8 mg/100 g) ao teor da antocianina que sofreu degradação (3,8 mg/100 g). A procedência do restante do ácido gálico formado no PJB pode ter sido, supostamente, dos AX, assim como ocorreu nos pães integrais. Ainda na fração solúvel, os teores dos ácidos elágico e 3,4-dihidroxibenzóico não apresentaram diferença significativa após o bioprocessamento.

Tabela 5. Teor de compostos fenólicos (mg/100g, bs) nos pães integral e adicionado da farinha de jabuticaba controle e bioprocessados[1].

Composto	Extrato	Pão integral		Pão de jabuticaba	
		Controle	Bioprocessado	Controle	Bioprocessado
Ácido ferúlico	*Fração solúvel*	2,4±0,2^{aA}	5,0±0,7^{bA}	1,3±0,0^{aA}	5,2±1,2^{bA}
Ácido gálico		ND[2]	ND[2]	ND[2]	25,8±6,2
Ácido elágico		ND[2]	ND[2]	1,80,3^{a}	2,2±0,3^{a}
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico		ND[2]	ND[2]	3,4±0,1^{a}	4,5±1,3^{a}
Delfinidina-3-*O*-glicosídeo		ND[2]	ND[2]	3,7±0,1^{a}	3,3±0,2^{b}
Cianidina-3-*O*-glicosídeo		ND[2]	ND[2]	17,9±1,3^{a}	14,7±0,2^{b}
Subtotal		***2,5±0,1^{aA}***	***5,0±0,7^{bA}***	***24,8±2,9^{aB}***	***32,7±3,5^{bB}***
Ácido ferúlico	*Fração insolúvel*	149,0±10,5^{aA}	139,2±1,2^{aA}	134,9±0,6^{aA}	146,9±1,8^{aA}
Ácido gálico		ND[2]	ND[2]	61,5±2,5^{a}	73,6±8,8^{a}
Ácido elágico		ND[2]	ND[2]	26,0±1,3^{a}	24,6±0,6^{a}
Ácido cafeico		6,2±0,4^{aA}	4,7±0,2^{bA}	6,3±0,3^{aA}	6,4±0,5^{aB}
Ácido *p*-cumárico		3,1±0,6^{aA}	2,1±0,1^{bA}	2,5±0,2^{aB}	3,2±0,1^{Bb}
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico		ND[2]	ND[2]	6,4±0,2^{a}	13,1±1,2^{b}
Subtotal		***151,8±10,8^{aA}***	***145,7±1,1^{aA}***	***239,2±1,9^{aB}***	***149,0±8,0^{aB}***
Total		**154,3±10,8^{aA}**	**150,4±3,9^{aA}**	**264,0±1,1^{aB}**	**281,7±4,5^{aB}**

[1]Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os processamentos (controle e bioprocessado), para um mesmo tipo de pão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os diferentes tipos de pão dentro do mesmo processamento (Two-Way Anova seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$). [2]Não detectado.

Na fração insolúvel dos PJ e PJB, o composto que foi detectado em maior teor foi o ácido ferúlico (133,0 mg/100 g e 147,9 mg/100 g, respectivamente) e não obtiveram diferença significativa entre si (**Tabela 5**). Já em relação aos teores de ácido elágico, não houve diferença significativa do mesmo após o bioproessamento do PJ. Por último, ainda na fração insolúvel, ainda houve aumento significativo dos teores dos ácidos 3,4-dihidroxibenzóico e *p*-cumárico. HOLTEKJØLEN et al. (2008) também observaram aumento de compostos fenólicos insolúveis pães adicionados de farinha de cevada após a cocção. Já foi relatado na literatura que os teores de alguns compostos fenólicos sob a forma agliconas aumentaram após a bioprocessamento enzimático (KOISTINEN et al., 2016). É provavel então que o aumento dos teores compostos insolúveis (ácidos 3,4-dihidroxibenzóico e *p*-cumárico) seja proveniente dos ácidos ferúlicos acoplados aos AX que sofreram clivagem por ação da cocção e da xilanase.

Além dos compostos citados na **Tabela 5,** também foram quantificadas duas metilxantinas, sendo elas cafeína e teobromina, provenientes do fermentado de cacau de onde foi extraída a xilanase. O teor de teobromina no PIB e no PJB foi, respectivamente, 9,6 mg/100 g e 11,2 mg/100g, sem diferença significativa entre os dois pães. A cafeína só foi identificada no PIB (1,5 mg/100 g). Esse padrão, onde as concentrações de teobromina se encontram superiores do que as de cafeína são inerentes do cacau e dependem do grau de fermentação (TODOROVIC et al., 2015). As metilxantinas encontradas no cacau, ao serem consumidas por indivíduos saudáveis podem levar a mudanças de humor e comportamento, tornando-os mais enérgicos, motivados para o trabalho e aumentar o estado de alerta (SMIT et al., 2004). Além desses efeitos, já foi observado um papel na redução da glicemia (SARRIA et al., 2014).

3.4. Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante (CA) dos pães elaborados foi analisada a partir dos mesmos extratos utilizados para a caracterização do perfil de compostos fenólicos por CLAE. Logo, a CA foi determinada tanto para a fração solúvel, quanto para as frações insolúveis das amostras de pães estudadas.

A CA avaliada pelos métodos FRAP e *Folin-Ciocalteu* foi maior para o PI (631,5 mmol Fe^{2+}/100 g e 730,4 g EAG/100 g, respectivamente) em relação a PJ (512,2 mmol Fe^{2+}/100 g e 485,0 g EAG/100 g, respectivamente). O contrário ocorreu para o método TEAC, onde o PI apresentou maior CA (20,2 mmol ET/100 g) em comparação

ao PJ (12,5 mmol ET/100 g). Porém, se observarmos apenas a fração solúvel destes pães, nota-se que o pão adicionado de farinha de subproduto de jabuticaba possui CA superior nesta fração em relação ao pão integral controle quando avaliado pelos três métodos, o que é interessante, uma vez que esta fração apresenta os compostos antioxidantes mais bioacessíveis ao organismo humano. Adicionalmente, ao se bioprocessar o PJ, a capacidade antioxidante aumentou 45%, 37% e 29% para FRAP, TEAC e *Folin-Ciocalteu*, respectivamente (**Tabela 6**).

Em relação ao total, a fração solúvel apresentou a menor CA quando avaliada pelos três métodos (**Tabela 6**), resultado semelhante aos descritos nos trabalhos de CASTELO-BRANCO et al., (2016) e KTENIOUDAKI et al., (2015). Observou-se que a adição da farinha de jabuticaba aumentou a CA nos pães, devido, principalmente, a presença das antocianinas **(**INADA et al., 2015).

Já foi descrito na literatura que o bioprocessamento enzimático é capaz de aumentar a CA na fração solúvel dos cereais **(**KATINA et al., 2007b; KTENIOUDAKI et al., 2015). Portanto, sugere-se que os compostos fenólicos insolúveis presentes no PJB sofreram clivagem em algumas de suas ligações beta-glicosídicas devido a ação do extrato enzimático de cacau adicionado. Logo, as enzimas podem ter agido, tanto nas estruturas das paredes celulares dos cereais, quanto nas moléculas das antocianinas presentes em suas frações solúveis **(**e que não estão presentes no pão integral). PLAZA et al. **(**2014) observaram que formas agliconas possuem capacidade antioxidante superiore às formas glicosiladas, e as antocianinas presentes no PJB podem ter se convertido na forma aglicona com a ação da xilanase.

Especula-se que, em relação ao pão de jabuticaba, seja interessante utilizar o extrato enzimático proveniente do cacau (ação predominante é a xilanase) juntamente com a Celumax (ação predominante é a celulase), pois os tipos de compostos fenólicos encontrados na farinha de trigo integral são diferentes dos enconotrados na jabuticaba de jabuticaba. Os compostos fenólicos da jabuticaba apresentam mais ligações glicosídicas, e a Celumax é um complexo enzimático que, teoricamente, teria mais efeito mais sob esse tipo de ligação. Já a farinha de trigo integral é rica em ácido ferúlico e outros ácidos fenólicos hidroxicinâmicos, que possuem, predominantemente, ligações éster. Sabe-se que uma das principais ações da xilanase é a feruloil esterase. Portanto, a utilização das duas enzimas juntas no pão de jabuticaba poderia ser benéfica. Na literatura, a ação das xilanases, bem como outras enzimas acessórias, já foi utilizada para melhorar a conversão de celulose, removendo a hemicelulose e aumentando a

acessibilidade do substrato às celulases. A aplicação de xilanases e enzimas acessórias em conjunto com enzimas celulolíticas foi previamente considerada para a bioconversão de materiais lignocelulósicos (BRAGA et al., 2014).

Em relação as frações insolúveis, o bioprocessamento enzimático gerou efeito nos pães e causou diferença significativa nos dados dos 3 métodos analisados, tanto no pão integral quanto no pão de farinha do subproduto da jabuticaba. O efeito do bioprocessamento no pão integral foi negativo, visto que a CA reduziu. Segundo YADAV et al. **(**2013), a diminuição da capacidade antioxidante pode ocorrer como resultado da liberação inicial de monômeros de fenólicos livres, seguidos pela liberação de polímeros fenólicos. Já para o pão adicionado de farinha do subproduto da jabuticaba, o efeito foi inverso e houve um aumento da CA nas duas frações e nos três métodos, algo que já foi reportado anteriormente na literatura (CODA et al., 2014; KATINA et al., 2007a; KTENIOUDAKI et al., 2015).

Tabela 6. Capacidade antioxidante dos pães integrais e de jabuticaba controle e bioprocessados determinada pelos métodos de Folin-Ciocalteu, FRAP e TEAC[1].

Método	Extrato	Pão integral		Pão de jabuticaba	
		Controle	Bioprocessado	Controle	Bioprocessado
Folin-Ciocalteu (g EAG[2]/100 g)	*Fração solúvel*	59,6±1,0 aA	74,9±2,4 Aa	129,9±5,2 aB	182,3±10,8 bB
	Fração insolúvel	570,8±1,2 aA	546,6±10,6 bA	355,1±5,2 aB	890,1±4,3 bB
	Total	730,4±164,4 aA	621,5±120,6 bA	485,0±32,7 aB	1072,4±151,8 bB
FRAP (mmol Fe^{2+}/100 g)	*Fração solúvel*	31,0±0,2 aA	31,2±0,6 aA	112,8±4,6 aB	203,9±8,1 bB
	Fração insolúvel	600,5±2,7 aA	537,2±3,5 bA	399,4±6,6 aB	969,4±5,4 bB
	Total	631,5±155,5 aA	568,4±137,3 bA	512,2±51,1 aB	1173,3±166,6 bB
TEAC (mmol ET[3]/100 g)	*Fração solúvel*	0,3±0,1 aA	0,4±0,0 aA	3,7±0,0 aB	5,9±0,3 bB
	Fração insolúvel	12,2±0,1 aA	7,5±0,2 bA	16,5±0,6 aB	28,2±0,3 bB
	Total	12,5± 4,0 aA	7,9±2,6 bA	20,2±2,8 aA	34,1±5,5 bB

Resultados expressos em base seca como média±desvio padrão de triplicata. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa do bioprocessamento para um mesmo tipo de pão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa da adição da farinha de jabuticaba dentro do mesmo processamento (Two-way Anova, seguido de pós-teste de Bonferroni, $p<0,05$). [2]Equivalentes de ácido gálico. [3]Equivalentes de Trolox

3.4. Qualidade microbiológica e análise sensorial

Ambos os pães apresentaram qualidade microbiológica dentro do preconizado pela RDC n° 12 (ANVISA), demonstrando ausência de coliformes a 45 ^{o}C e salmonela.

Os 100 provadores degustaram os quatro pães ofertados (PI, PJ, PIB e PJB) e analisaram as amostras segundo os sete atributos e a intenção de consumo e de compra (**Tabela 7**). Pode-se observar que todos os aspectos avaliados possuem o mesmo padrão, onde a adição da farinha de jabuticaba exerceu alteração negativa na aceitação pelos provadores. Já o bioprocessamento não gerou diferença sensorial significativa nas notas dadas aos atributos analisados, com exceção do aroma e da cor da casca, assim como os resultados analisados por KTENIOUDAKI et al. **(**2015). Entretanto, mesmo obtendo notas inferiores quando comparado aos pães integrais, todos os atributos avaliados do pão de jabuticaba se mantiveram acima da média mínima de aceitação (maior ou igual a 5).

Tabela 7. Perfil sensorial dos pães de jabuticaba e integral controles e bioprocessados (*n*=100)[1].

	Pão integral	**Pão integral**	**Pão de jabuticaba**	**Pão de jabuticaba**
Aspectos	**Controle**	**Bioprocessado**	**Controle**	**Bioprocessado**
Atributos[2]				
Impressão global	7,1±1,7^{aA}	7,2±1,6^{aA}	5,8±2,3^{aB}	5,8±2,1^{aB}
Aroma	7,0±1,5^{aA}	7,3±1,7^{aA}	6,6±1,8^{aA}	6,7±1,7^{aA}
Cor da casca	7,3±1,6^{aA}	7,5±1,3^{aA}	6,6±2,2^{aA}	6,4±2,2^{aB}
Cor do miolo	7,4±1,6^{aA}	7,4±1,5^{aA}	6,6±2,3^{aB}	6,4±2,1^{aB}
Sabor	7,1±1,6^{aA}	7,0±1,7^{aA}	5,3±2,7^{aB}	5,6±2,4^{aB}
Textura	7,2±1,7^{aA}	7,1±1,6^{aA}	6,0±2,1^{aB}	6,1±2,3^{aB}
Gosto residual	7,0±1,9^{aA}	7,1±1,7^{aA}	5,1±2,8^{aB}	5,6±2,6^{aB}
Intenção de consumo[3]	4,7±1,6^{aA}	4,6±1,5^{aA}	3,5±1,9^{aB}	3,6±1,9^{aB}
Intenção de compra[4]	3,6±1,1^{aA}	3,5±1,0^{aA}	2,7±1,4^{aB}	2,9±1,5^{aB}

[1]Resultados expressos como média±desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os processamentos (controle e bioprocessado), para um mesmo tipo de pão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os diferentes tipos de pão dentro do mesmo processamento (One-way anova, seguido de pós-teste de Tukey, $p<0,05$). [2]Escala de nove pontos (1 = desgostei extremamente; 5 = não gostei, nem desgostei; 9 = gostei extremamente). [3]Escala de sete pontos (1 = nunca comeria; 4 = comeria ocasionalmente; 7 = comeria sempre). [4]Escala de cinco pontos (1 = certamente não compraria; 2 = provavelmente não compraria;3 = talvez compraria, talvez não compraria; 5 = certamente compraria).

4. Conclusão

Dentre as opções de enzimas estudadas, a adição do fermentado de cacau, fonte de xilanase demonstrou melhores resultados na farinha integral, sendo escolhida para ser adicionada nos pães do presente estudo.

Para os pães integrais, o bioprocessamento aumentou o volume e reduziu a densidade dos pães. Porém, o contrário foi visto para o pão de jabuticaba. Além disso, a adição da xilanase não alterou o pH em nenhuma das duas amostras (integral e de jabuticaba), porém escureceu ambas o que pode ser visto pela redução dos valores do parâmetro *L**, visto que é uma enzima extraída de um fermentado de cacau amarronzado.

Em relação à capacidade antioxidante, os três métodos (FRAP, TEAC e *Folin-Ciocalteu*) apresentaram um comportamento comum, cuja atividade antioxidante na fração solúvel se manteve constante no pão integral e aumentou no pão de jabuticaba, após o bioprocessamento. Já nas frações insolúveis, a adição de enzimas gerou a redução da capacidade antioxidante dos pães integrais e o aumento dessa atividade nos pães de jabuticaba.

O principal composto encontrado nos pães integral e de jabuticaba, tanto controle quanto bioprocessado, foi o ácido ferúlico, na fração insolúvel. Porém, depois do bioprocessamento, o percentual deste ácido na fração solúvel aumentou significativamente em ambos os pães. No PJB, o aumento do teor de compostos fenólicos da fração solúvel foi maior do que do PIB, principalmente devido ao aparecimento do ácido gálico. Ressaltando que, nos PI e PIB, esta fração se resume apenas ao ácido ferúlico. Nos PJ e PJB ainda foram identificadas duas antocianinas (delfinidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo), provenientes da adição da farinha do subproduto da jabuticaba, que sofreram deglicosilação com o bioprocessamento.

Com isso, conclui-se que, apesar do bioprocessamento não ter alterado significativamente volume e densidade dos pães de farinha do subproduto da jabuticaba, este melhorou seus perfis de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, além de ter obtido notas acima da média na análise sensorial pelos provadores. Portanto, acredita-se ser um potencial produto a se comercializar, com possíveis benefícios a saúde.

Considerações finais

No decorrer dessa dissertação foram desenvolvidos dois capítulos com objetivos distintos. Durante o desenvolvimento desses dois capítulos foi possível observar que em relação à farinha de jabuticaba é preciso desenvolver outra maneira de armazená-la para que esta se mantenha estável por mais tempo de estocagem, a fim de preservar os compostos fenólicos e as características físicas e sensoriais.

Outro fator que foi avaliado foi o efeito da cocção. Porém, em muitos momentos foi difícil atribuir se as consequências identificadas no pão foram devido ao aumento da temperatura ou a ação do fermento utilizado. Em um próximo estudo, seria interessante preparar uma outra amostra de um pão sem fermento. Além disso, não foram quantificadas melanoidinas, e sabe-se que são compostos importantes e influentes na capacidade antioxidante do pão coccionado.

Nos pães bioprocessados, observou-se que os pães com farinha de jabuticaba não obtiveram tantos benefícios sensoriais quanto os pães integrais. Portanto, sentiu-se a necessidade de, em trabalhos futuros, realizar testes com o pão adicionado da farinha de jabuticaba e não apenas no pão integral, visto que o pão enriquecido do fruto pode necessitar de quantidades superiores da xilanase ou até de enzimas complementares em sua composição para obter o mesmo efeito que o pão integral.

Referências bibliográficas

ABAZA, L.; AAMALLI, A.; NSIR, H.; ZARROUK, M. Olive Tree (Olea europeae L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. **Antioxidants (Basel)**, n. 4, v. 4, p. 682-98, 2015.

ABDEL-AAL, E. S. M.; RABALSKI I. Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products. **Journal of Cereal Science**, v. 57, p. 312-318, 2013.

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. 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**, v. 9, p. 1679-1687, 2012.

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46-55, 2014.

ADOM K.K.; LIU R.H. Antioxidant activity of grains, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6182–6187, 2002.

ADOM, K.K.; SORRELLS, M.E.; LIU, R.H. Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Wheat Varieties, **J. Agric. Food Chem**., v.51, p. 7825-7834, 2003.

ALEZANDRO, M. R.; DUBÉ, P.; DESJARDINS, Y.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. 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**, n. 54, v. 1, p. 468-477, 2013.

ALEZANDRO, M.R.; LAJOLO, F M.; GENOVESE, M. Functional potential of jaboticaba, a Brazilian native fruit. **Pacifichem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies**, Honolulu, HI, United States, AGRO-260, 2010.

ALTUNKAYA, A.; HEDEGAARD, R. V.; BRIMER, L.; GO¨KMEN, V.; SKIBSTED; L. Antioxidant capacity versus chemical safety of wheat bread enriched with pomegranate peel powder, **Food and Function**, v. 4, p. 722-727, 2013.

ALVES, G.; PERRONE, D. Breads enriched with guava flour as a tool for studying the incorporation of phenolic compounds in bread melanoidins. **Food Chemistry**, v. 185, p. 65-74, 2015.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMIST (AACC) International. Approved Methods of AACC International. 10. ed. St. Paul, MN, 2001.

AMORIM, G.M.; OLIVEIRA, A.C.; GUTARRA, M.L.E.; GODOYC, M.G.; FREIREA, D.M.G. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** v. 11, p. 34–41, 2017.

ANSON, N. M.; AURA, A.; SELINHEIMO, E.; MATTILA, I.; POUTANEN, K.; van den BERG, R.; HAVENAAR, R.; BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. Bioprocessing of Wheat Bran in Whole Wheat Bread Increases the Bioavailability of Phenolic Acids in Men and Exerts Antiinflammatory Effects ex Vivo1–3, **The Journal of Nutrition Nutritional Immunology,** 2010. doi: 10.3945/jn.110.127720

ANSON, N. M.; HAVENAAR, R.; VAES, W.; COULIER, L.; VENEMA, K.; SELINHEIMO, E.; BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. Effect of bioprocessing of wheat bran in wholemeal wheat breads on the colonic SCFA production in vitro and postprandial plasma concentrations in men, **Food Chemistry**, v. 128 p. 404-409, 2011.

ANSON, N. M.; SELINHEIMO, E.; HAVENAAR, R.; AURA, A.; MATTILA, I.; LEHTINEN, P.; BAST, A.; POUTANEN, K.; HAENEN, G. R. M. M. Bioprocessing of Wheat Bran Improves in vitro Bioaccessibility and Colonic Metabolism of Phenolic Compounds, **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 6148-6155, 2009. doi: 10.1021/jf900492h

ANVISA. Resolução nº 57/2012 de 19 de novembro de 2012. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0057_19_11_2012.html

ANWAR, J. S.; SPECIALE, A.; FRATANTONIO, D.; CRISTANI, M.; SAIJA, A.; VIRGILI, F.; CIMINO, F. Cyanidin-3-O-glucoside modulates intracellular redox status and prevents HIF-1 stabilization in endothelial cells in vitro exposed to chronic hypoxia,**Toxicol. Lett**., v. 226, p. 206-213, 2014.

ARTE, E.; RIZZELLO, C. G.; VERNI, M.; NORDLUND, E.; KATINA, K.; CODA R.Impact of Enzymatic and Microbial Bioprocessing on Protein Modification and Nutritional Properties of Wheat Bran, **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, p. 8685-8693, 2015. doi: 10.1021/acs.jafc.5b03495.

ASCHERI, D. P. M.; ASCHERI, J. L. M.; CARVALHO, C. W. P. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 26, n. 4, p. 1-9, 2006.

ASP, N. G.; JOHANSON, C.; HALLMER, H.; SILJESTROM, M. Rapid enzimatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 31, p. 476-482, 1983.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 15. ed. Washington: AOAC, 1990.

AUTIO, K. Effects of cell wall components on the functionality of wheat gluten, **Biotechnology Advances** v. 24 p. 633-635, 2006.

BAKOWSKA, A.; KUCHARSKA, A. Z.; OSZMIAN, J. The effects of heating , UV irradiation , and storage on stability of the anthocyanin – polyphenol copigment complex, **Food Chemistry**, v. 81, p. 349–355, 2003.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. V. 99, p. 191–203, 2006.

BENNET, L. E.; JEGASOTHY, H.; KONCZAK, I.; FRANK, D.; SUDHARMARAJAN, S.; CLINGELEFFER, P. R. Total polyphenolics and anti-oxidant properties of selected dried fruits and relationships to drying conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 115-124, 2011.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, **Analytical Biochemistry**, n. 1, v. 239, p. 70-76, 1996.

BHOL, S.; LANKA, D.; BOSCO, S.J.D. Quality characteristics and antioxidant properties of breads incorporated with pomegranate whole fruit bagasse, **J Food Sci Technol**, v. 53, n.3, p. 1717–1721, 2016.

BORRELLI R. C.; MENNELLA C.; BARBA F.; RUSSO M.; RUSSO G. L.; KROME K.; ERBERSDOBLERC K. F.; FAISTC V.; FOGLIANO V. Characterization of coloured compounds obtained by enzymatic extraction of bakery products, **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1367-1374, 2003.

BORGES, G. D. S. C., VIEIRA, F. G. K., COPETTI, C., GONZAGA, L. V., ZAMBIAZI, R. C., FILHO, J. M., & FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44 n. 7, p. 2128-2133, 2011.

BOZ, H. Ferulic Acid in Cereals – a Review Czech **J. Food Sci.**, v. 33, p. (1): 1–7, 2015. doi: 10.17221/401/2014-CJFS

BRAGA C.M.P.; DELABONA P.D.S.; LIMA D.J.D.S.; PAIXÃO D.A.A.; PRADELLA J.D.C.; FARINAS C.S. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced on-site

improves sugarcane bagasse hydrolysis, **Bioresource Technology**, v. 170, p. 316–324, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.90 de 17 de outubro de 2000. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pão. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2000.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº.31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). Diário Oficial da União, (11-E):5, Seção 1, Brasília, DF, 16 jan. 1998.

BRASIL. Resolução n.12 – CNNPA, de 24 julho de 1978. A CNNPA do Ministério da Saúde aprova 47 padrões de identidade e qualidade relativos a alimentos e bebidas para serem seguidos em todo território brasileiro. Diário Oficial da União, Seção, 1978.

BRITO, E.S.; ARAÚJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9389–9394, 2007.

BRITTON, H.T.S.; ROBINSON, R.A. Universal Buffer solutions and the dissociation constant of veronal, **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 1456-1462, 1931

CANTWELL, M. Properties and recommended conditions for storage of fresh fruits and vegetables, **Davis, University of California: Postharvest Technology Research Information Center**, 2001. Available from: http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/Storage/prop_hk.shtml

CARLHOSENEY, R. *Analysis of Bioactive Components in Small Grain Cereals* November 2010,v. 52, Issue 3, p. 520.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.D.L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review, **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009.

CASTELO-BRANCO V. N.; LAGO M. G.; MINUZZO D. A.; MOURA-NUNE N.; TORRES A. G.; NUNES J. C.; MONTEIRO M. Bread formulated with guava powder was enriched in phenolic and aroma compounds, and was highly acceptable by consumers. **Journal of food Science and Technology**, v. 53, n. 12, p. 4168-4178, 2016.

CHOI, M. H.; KIM, G. H.; LEE, H. S. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (Citrus sinensis) juice during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 35, p. 753-759, 2002.

CITADIN, I.; DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z. Jabuticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, n. 2, v. 32, p. 577-583, 2010.

CODA, R.; KATINA, K.; RIZZELLO, C. G. Bran bioprocessing for enhanced functional properties,**Food Science**, v. 1 p. 50-55, 2015.

CODA, R.; RIZZELLO C. G.; CURIEL, J. A.; B, POUTANEN, K.; KATINA, K.; Effect of bioprocessing and particle size on the nutritional properties of wheat bran fractionsa Innovative, **Food Science and Emerging Technologies**, v. 25 p. 19-27, 2014.

COELHO, E. M.; GOMES, R.; MACHADO, B. A.; OLIVEIRA, R. S.; LIMA, M. DOS S.; DE AZEVEDO, L. C.; UMSZA GUEZ, M. A. Passion fruit peel flour e Technological properties and application in food products. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 158-164, 2017.

COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making, **J. Cereal Sci.**, v. 35 p. 225-243, 2002.

COURTIN, C. M.; GELDERS, G. G.; DELCOUR, J. A. Use of two endoxylanases with different substrate selectivity for understanding arabinoxylan functionality in wheat flour breadmaking, **Cereal Chem.**, v. 78, p. 564-71, 2001.

DAI, J.; GUPTE, A.; GATES, L.; MUMPER, R. J. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms, **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 837–847, 2009.

DELCOURA, J. A.; ROUAUB, X.; COURTINA, C. X.; POUTANENC, K.; RANIERI, R. Technologies for enhanced exploitation of the health-promoting potential of cereals, **Trends in Food Science & Technology**, v. 25 p. 78-86, 2012.

DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F. J. Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1403–1407, 2005.

DESSIMONI-PINTO, N. A. V.; MOREIRA, W. A.; CARDOSO, L. M.; PANTOJA, L. A. Jaboticaba peel for jelly preparation: an alternative technology.**Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 4, v. 31, p. 864-869, 2011.

DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; DA SILVA, T. L. T.; LIMA, L. C. D. O.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362-368, 2014.

DINELLI, D.; SEGURA-CARRETEROB, A.; DI SILVESTRO, R.; MAROTTIA, I.; ARRÁEZ-ROMÁNB, D.; BENEDETTELLID, S.; GHISELLI, L.; FERNADEZ-GUTIERREZB, A. 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,** v. 1218, p. 7670– 7681, 2011.

DING, M.; FENG, R. WANG, S. Y.; BOWMAN, L.; LU, Y.; QIAN, Y.;

CASTRANOVA, V.; JIANG, V. H.; SHI, X. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity, **Journal of Biology Chemestry**, v. 281, p. 7359-17368, 2006.

DZIKIA, D.; R_O_ZY1OB, R.; GAWLIK-DZIKIC, U.; SWIECA, M. Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds, **Trends in Food Science & Technology,** v. 40, p. 48-61, 2014.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*).**Food Chemistry**, v. 139, p. 578-588, 2013.

FRANCO, G. Tabela de composição química de alimentos. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

FREDERIX, S. A.; VAN HOEYMISSEN. K.; COURTIN, C. M.; DELCOUR, J. A. Waterextractable and water-unextractable arabinoxylans affect gluten agglomeration behavior during wheat flour gluten-starch separation, **J. Agric. Food Chem.**, v. 52 p. 7950-7956, 2004.

GARCIA-VIGUERA, C.; BRIDLE, P. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylium salts with ascorbic aci. **Food Chemistry**, v. 64, p. 21-26, 1999.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, p. 149-164, 2017.

GANI A.;WANI S.M.; MASOODI F.A.; HAMEED G. Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits, **Journal of Food Processing & Technology**, v. 3, p. 146, 2012.

GHOSE (1987) *Measurement of cellulose activities*.**IUPAC – Pure and Applied Chemistry** ,1987, v. 59, p. 257-268.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality, **Trends Food Sci. Technol.**, V. 16 p. 12-30, 2005.

GÓRNAS P.; JUHNÉVICA-RADENKOVA K.; RADENKOVS V.; MISINA I.; PUGAJEVAI.; SOLIVEN A.; SEGLIN D. The impact of different baking conditions on the stability of the extractable polyphenols in muffins enriched by strawberry, sour cherry, raspberry or black currant pomace, **Food Science and Technology**, v. 65, p. 946-953, 2016

GURAK P. D.; BONA G. S.; TESSARO I. C.; MARCZAK L. D. F. 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**, v. 62, p. 786-792, 2014.

GRUNDAS, S. WHEAT | Grain Structure of Wheat and Wheat-based Products. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, p. 6137-6146, 2003. DOI 10.1016/B0-12-227055-X/01286-4.

HAGER T. J.; HOWARD L. R.; PRIOR R. L. Processing and Storage Effects on the Ellagitannin Composition of Processed Blackberry Products, **J. Agric. Food Chem**., v. 58, p. 11749-11754, 2010.

HEMERY Y. M.; ANSON N. M; HAVENAAR R.; HAENEN G. R. M. M.; NOORT M. W. J.; ROUAU X. Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions, **Food Research International**, v. 43, p. 1429-1438, 2010.

HO L.; AZIZ1 N. A. A.; AZAHARI B. Physico-chemical characteristics and sensory

evaluation of wheat bread partially substituted with banana (Musa acuminata X balbisiana cv. Awak) pseudo-stem flour, **Food Chemistry**, v. 139, p. 532-539, 2013.

HOLTEKJØLEN, A.K.; BVRE, A.B.; RØDBOTTEN, M.; BERG, H.; KNUTSEN, S.H. Antioxidant properties and sensory profiles of breads containing barley flour, **Food Chemistry,** v. 110, p. 414–421, 2008.

HSU, J.; WU, C.; HUNG, C.; WANG C.; HUI-PEIUANG. Myrciaria cauliflora extract improves diabetic nephropathy via suppression of oxidative stress and inflammation in streptozotocin-nicotinamide mice. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, p. 730-737, 2016.

HUG-ITEN S.; HANDSCHIN S.; CONDE-PETIT B.; ESCHER F. Changes in Starch Microstructure on Baking and Staling of Wheat Bread, **Lebensm.-Wiss. u.-Technol**, n. 5, v. 00, p. 255-260, 1999.

HUR, S.J.; LEE, S.Y.; KIM, Y.C.; CHOI, I.; KIM, G.B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods, **Food Chemistry**, v. 160, p. 346–356, 2014.

INADA, K.; OLIVEIRA, A. A.; REVORÊDO, T. B.; MARTINS, A. B. N.; LACERDA, E. C. Q.; FREIRE, A. S.; BRAZ, B. F.; SANTELLI, R. E.; TORRES, A. G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. C. Screening of the chemical composition and occurring antioxidants in jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) and jussara (*Euterpe edulis*) fruits and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 422-433, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JENSEN, S.; OESTDAL, H.; CLAUSEN, M.R.; ANDERSEN, M.L.; SKIBSTED L.H. Oxidative stability of whole wheat bread during storage, **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 637-642, 2011.

KATINA, K.; JUVONEN, R.; LAITILA, A.; FLANDER, L.; NORDLUND, E.; KARILUOTO, S.; PIIRONEN. V.; POUTANEN, K. Fermented wheat bran as a functional ingredient in baking, **Cereal Chem.**, v. 89, p. 126-134, 2012.

KATINA, K., LAITILA, A., JUVONEN, R., LIUKKONEN, K. H., KARILUOTO, S., PIIRONEN, V.; LANDBERG, R.; AMAN, P.; POUTANEN, K.Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 175–186, 2007a.

KATINA, K.; LIUKKONEN, K. H.; KAUKOVIRTA-NORJA, A.; ADLERCREUTZ, H.; HEINONEN S.; LAMPI, A. M.; PIHLAVA, J.; POUTANEN, K. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. **Journal of Cereal Science**, v. 46, p. 348-355, 2007b.

OEGELENBERG, D.; F.A., A. Chimphango Effects of wheat-bran arabinoxylan as partial flour replacer on bread properties, **Food Chemistry,** v. 221, p. 1606–1613, 2017.

KOISTINEN, V.M.; KATINA, K.; NORDLUNDC, E.; POUTANEN, K.; HANHINEVA, K. Changes in the phytochemical profile of rye bran induced by enzymatic bioprocessing and sourdough fermentation, **Food Research International,** v. 89, p. 1106–1115, 2016.

KTENIOUDAKI, A.; ALVAREZ-JUBETE, .; SMYTHC, T. J.; KILCAWLEY, K.; RAI, D. K. Eimear Gallagher a Application of bioprocessing techniques (sourdough fermentation and technological aids) for brewer's spent grain breads,**Food Research International**, v. 73 p. 107-116, 2015.

KTENIOUDAKI, A.; GALLAGHER, E. Recent advances in the development of high-fibre baked products;**Trends in food science & technology**, v. 28, n. 1, p. 4 – 14, 2012.

LARROSA, M.; GARCÍA-CONESA, M. T.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health, **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 513-539, 2010.

LEÃO, D. A.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BASTOS, R.; COIMBRA, M. A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and

proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasilense* Camb.) fruit by-products,**Food Chemistry**, v. 225, p. 146-153, 2017.

LEITE-LEGATTI, A. V.; BATISTA, A. G.; DRAGANO, N. R. V.; MARQUES, A. C.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; MACHADO, A. R. T.; CARVALHO-SILVA, L. B.; RUIZ, A. L.; DE CARVALHO, J. E.; PASTORE, G. M.; JÚNIOR, M. R. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities, **Food Research International**, v. 49, p. 596-603, 2012.

LENQUISTE, S. A.; BATISTA, A. G.; SILVA MARINELI, R.; DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA JR, M. R. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, p. 153–160, 2012.

LINDENMEIER, M.; FAIST, V.; HOFMANN, T. Structural and Functional Characterization of Pronyl-lysine, a Novel Protein Modification in Bread Crust Melanoidins Showing in Vitro Antioxidative and Phase I/II Enzyme Modulating Activity, **Journal of Agricultural and** Food **Chemistry**, v. 50, p. 6997−7006, 2002.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12 Suppl, p. 3479S–3485S, 2004.

LIU, R.H. Whole grain phytochemicals and health. **J. Cereal Sci.**, v. 46, p. 207-219, 2007.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols : food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects, **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 185-195, 2014. .

MAZZONE, G.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. Antioxidant properties comparative study of natural hydroxycinnamic acids and structurally modified derivatives: Computational insights, **Computational and Theoretical Chemistry,** v. 1077, p. 39–47, 2016

MEILGAARD, M. R.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T.*Sensory evaluation techniques*. 4. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

MERCALI, G.D.; GURAK, P.D.; SCHMITZ, F.; MARCZAK, L.D.F. Evaluation of non-thermal effects of electricity on anthocyanin degradation during ohmic heating of jaboticaba (Myrciaria cauliflora) juice, **Food Chemistry**, v.171, p. 200–205, 2015.

MESSIA, M. C.; REALE, A, MAIURO, L.; CANDIGLIOTA, T.; SORRENTINO, E.; MARCONI, E. Effects of pre-fermented wheat bran on dough and bread characteristics, **Journal of Cereal Science**, v. 69 p. 138-144, 2016.

MIHHALEVSKI, A.; HEINMAA, I.; TRAKSMAA, R.; PEHK, T.N.; MERE, A.; PAALME, T. Structural Changes of Starch during Baking and Staling of Rye Bread, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 8492-8500, 2012.

MICHALSKA, A.; AMIGO-BENAVENT, M.; ZIELINSKI, H.; DEL CATILLO, M.D. Effect of breadmaking on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread, **Journal of Cereal Science**, v. 48, p. 123-132, 2008. doi: 10.1016/j.jcs.2007.08.012.

MILLER, G.L. Use of dinitosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar, **Analytical Chemistry**, v. 31 p. 426-428, 1959.

N'DRI, D.; MAZZEO, T.; ZAUPA, M.; FERRACANE, R.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Effect of cooking on the total antioxidant capacity and phenolic profile of some whole-meal African cereals, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 29-36, 2012. doi: 10.1002/jsfa.5837

NOORT, M. W. J.; MATTILA, O.; KATINA, K.; van der KAMP, J. W. HealthBread: Wholegrain and high fibre breads with optimised textural quality, **Journal of Cereal Science**, v. 78, p. 57-65, 2017.

NORDLUND, E.; KATINA, K.; AURA, A. M.; POUTANEN, K. Changes in bran structure by bioprocessing with enzymes and yeast modifies the in vitro digestibility and fermentability of bran protein and dietary fibre complex, **J. Cereal Sci.**, v. 58 p. 200-208, 2013.

NUNES, J.C.; LAGO, M.G.; CASTELO-BRANCO V.N.; OLIVEIRA, F.R.; TORRES, A.G.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders, **Food Chemistry**, v. 197, p. 881–890, 2016.

OKARTER, N.; LIU, C.; SORRELLS, M.E.; LIU, R.H. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat, **Food Chemistry**, v. 119, p. 249–257, 2010.

OMS. Organização Mundial da Saúde. *Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry*. Technical Report Series, 854. Ginebra: OMS, 1995.

OSZMIANSKI, J.; KOLNIAK-OSTEKA, J.; LACHOWICZ, S.; GORZELANY, J.; MATŁOK, N. Effect of dried powder preparation process on polyphenolic content and antioxidant capacity of cranberry (Vaccinium macrocarpon L.), **Industrial Crops and Products**, v. 77 p. 658-665, 2015.

OTEIZA, P.I.; FRAGA, C.G.; MILLS, D.A.; TAF, D.H. Taf Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects, **Molecular Aspects of Medicine**, p. 1-9, 2017.

PLAZA, M.; BATISTA, A. G.; CAZARIN, C.; SANDAHL, M.; TURNER, C.; OSTMAN, F.; JUNIOR, M. R. Characterization of antioxidant polyphenols from Myrciaria jaboticaba peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185-197, 2016.

PLAZA, M.; POZZO, T.; LIU, J.Y.; ARA, K.Z.G.; TURNER, C.; KARLSSON, E.N. Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 3321–3333, 2014.

PEREIRA, L. D.; BARBOSA, J. M.; DA SILVA, A. J.; FERRI P. H.; SANTOS, S. C. Polyphenol and Ellagitannin Constituents of Jabuticaba (Myrciaria cauliflora) and Chemical Variability at Different Stages of Fruit Development, **J. Agric. Food Chem.**, v. 65, p. 120-1219, 2017. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02929

PODSĘDEK, A.; MAJEWSKA, I.; REDZYNIA, M.; SOSNOWSKA, D.; KOZIOŁKIEWICZ, M. In Vitro Inhibitory Effect on Digestive Enzymes and Antioxidant Potential of Commonly Consumed Fruits, **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, p. 4610−4617, 2014. doi: org/10.1021/jf5008264

PRABHASANKAR, P. & RAO, P.H. Effect of different milling methods on chemical composition of whole wheat flour, **European Food Research and Technology**, v. 213, p. 465-469, 2001.

RAMÍREZ-MAGANDA, J.; BLANCAS-BENÍTEZ, F. J.; ZAMORA-GASGA, V. M.; GARCÍA-MAGAÑA, M. DE L. Nutritional properties and phenolic content of a bakery product substituted with a mango (Mangifera indica) 'Ataulfo' processing by-product. **Food Research International**, v. 73, p. 117-123, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, n. 26 v. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REYNERTSON, K.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits, **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008.

REYNERTSON, K. A; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R; YANG, H.; 96

BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **J. Nat. Prod.,** v. 69, p. 1228-1230, 2006.

ROIDOUNG, S.; DOLAN, K. D.; SIDDIQ, M. Gallic acid as a protective ntioxidant against anthocyanin degradation and color loss in vitamin-C fortified cranberry juice, **Food Chemistry**, v. 210, p. 422-427, 2016.

ROSA-SIBAKOV, N.; HEINIO, R.; CASSAN, D.; HOLOPAINEN-MANTILA, U.; MICARD, V.; LANTTO, R.; SOZER, N. Effect of bioprocessing and fractionation on the structural, textural and sensory properties of gluten-free faba bean pasta, **Journal of Food Science Technology**, v. 67 p. 27-36, 2016.

TACO, *Tabela brasileira de composição de alimentos*, Campinas, NEPA-UNICAMP, 2006.

TANEYO, D. S.; DI SILVESTRO R.; DINELLI G.; GIANOTTI A. Effect of sourdough fermentation and baking process severity on dietary fibre and phenolic compounds of immature wheat flour bread LWT,**Food Science and Technology** v. 83 p. 26-32, 2017.

TODOROVIC, V.; REDOVNIKOVIC, I.R.; TODOROVIC, Z.; JANKOVIC, G.; DODEVSKA, M.; SOBAJIC, S. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia, **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 137–143, 2015.

SAA D. T.; SILVESTRO R. D.; DINELLI G.; GIANOTTI A. Effect of sourdough fermentation and baking process severity on dietary fibre and phenolic compounds of immature wheat flour bread, **Food Science and Technology**, v.83, p. 26-32, 2017.

SANCHO, R.A.S. & PASTORE, G.M. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes, **Food Research International**, v. 46, p. 378-386, 2012.

SANTOS, D.T. & MEIRELES, M.A.A. Jabuticaba as a source of functional pigments, **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, p. 137-142, 2009.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins, **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 444-452, 2012.

SARRIA, B.; MARTINEZ-LOPEZ, S.; SIERRA-CINOS, J.L.; GARCIA-DIZ, L.; GOYA, L.; MATEOS, R.; BRAVO, L. Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans, **J. Food. Chem.**, 2014. DOI: 11.004. http://dx.doi.org/10.1016/

SASAKI, R.; NISHIMURA, N.; HOSHINO, H.; ISA, Y.; KADOWAKI, M.; ICHI, T.; TANAKA, A.; NISHIUMI, S.; FUKUDA, L.; ASHIDA, H.; HORIO, F.; TSUDA, T. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice, **Biochemic Pharmacology**, v. 74, p.1619-1627, 2007.

SAVLAK, N.; TÜRKER, B.; YESILKANAT, N. Effects of particle size distribution on some physical, chemical and functional properties of unripe banana flour. **Food Chemistry,** v. 213, p. 180-186, 2016.

SENGUPTA, B.; BANERJEE, A.; SENGUPTA, P.K. Interactions of the plant flavonoid fisetin with macromolecular targets: insights from fluorescence spectroscopic studies, **J. Photochem. Photobiol. B: Biol**., v. 80, p. 79–86, 2005.

SEPÚLVEDA, L.; ASCACIO, A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, A.; AGUILERA-CARBÓ, A.; AGUILAR, C. N. Ellagic acid: biological properties and biotechnological development for production processes, **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 4518-4523, 2011.

SERRAINO, I.; DUGO, L.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; MAZZON, E.; DUGO, G.; CAPUTI, A. P.; CUZZOCREA, S. Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from

blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure, **Life Science**, v. 73, p. 1097-1114, 2003.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review.**Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SINELA, A. M.; MERTZ, C.; ACHIR, N.; RAWAT, N; VIDOT, K.; FULCRAND, H.; DORNIER M. Exploration of reaction mechanisms of anthocyanin degradation in a roselle extract through kinetic studies on formulated model media, **Food Chemistry**, v. 235, p. 67-75, 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, **Methods Enzymol**, v. 299, p. 152-179, 1999.

SIVAM, A. S.; SUN-WATERHOUSE, D.; QUEK, S.; PERERA, C. O. Properties of Bread Dough with Added Fiber Polysaccharides and Phenolic Antioxidants: A Review, **Journal of Food Science**, v. 75 p. 8, 2010.

SMIT, H.J.; GAFFAN, E.A.; ROGERS, P.J. Methylxanthines are the psycho-pharmaco-logically active constituents of chocolate. **Psychopharmacology**, v. 176, p. 412–419, 2014.

SOGI, D. S.; SIDDIQ, M.; DOLAN, K. D. Total phenolics, carotenoids and antioxidant properties of Tommy Atkin mango cubes as affected by drying techniques, **LWT – Food Science and Technology**, v. 62, p. 564-568, 2015.

STORCK, C. R.; BASSO, C.; FAVARIN F. R.; RODRIGUES, A. C. Qualidade microbiológica e composição de farinhas de resíduos da produção de suco de frutas em diferentes granulometrias, **Braz. J. Food Technol**, v. 18, n. 4, p. 277-284, 2015.

SUI, X.; YAP, P.Y.; ZHOU, W. Anthocyanins During Baking: Their Degradation Kinetics and Impacts on Color and Antioxidant Capacity of Bread, **Food Bioprocess Technol,** v. 8, p. 983–994, 2015. doi: 10.1007/s11947-014-1464-x

UCHOA, A. M.; DA COSTA, J. M.; MAIA, G.; MEIRA, T.; SOUSA, P. H.; BRASIL, I. M.Formulation and Physicochemical and Sensorial Evaluation of Biscuit-Type Cookies Supplemented with Fruit Powders, **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 153-159, 2009.

UGWUONA, F. U.; ONWELUZO, J. C. Assessment of Antioxidant Properties of Tamarind Fruit Pulp and its Effect on Storage Stability of African Bread Fruit Seed dhal and Flour, **NIFOJ**, v. 31 n. 2, p. 41-47, 2013.

VERMA, S.; SINGHB, A.; MISHRA, A. Gallic acid: Molecular rival of câncer, **Envi ronmental toxi cology and pharmacology**, v. 35, p. 473-485, 2013.

VERMERRIS, W. & NICHOLSON, R. *Phenolic Compound Biochemistry* (p. 283). Dordretch: Springer, 2006.

WANG L.; YAO Y.; HE Z.; WANG D.; LIU A.; ZHANG Y. Determination of phenolic acid concentrations in wheat flours produced at different extraction rates, **Journal of Cereal Science**, v. 57, p. 67–72, 2013.

WANG, T.; ZHU, Y.; SUN, X.; RADDATZ, J.; ZHOU, Z.; CHEN, G. Effect of microfluidisation on antioxidant properties of corn bran, **Food Chemistry,** v. 152, p. 37–45, 2014.

WU, S.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Metabolite Profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and Other Dark-Colored Fruit Juices, **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 7513-7525, 2012.

WU, S.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 7 p. 148–159, 2013.

XU, C.; WANG, B.; PU, Y.; TAO, J.; ZHANG, T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials, **Chinese Journal of Natural Medicines,** v. 15, p. 0721–0731, 2017.

YADAV, G.; SINGH, A.; BHATTACHARYA, P.; YUVRAJ, J.; BANERJEE, R.; Comparative analysis of solid-state bioprocessing and enzymatic treatment of finger millet for mobilization of bound phenolics,**Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 36 p. 1563-1569, 2013. doi: 10.1007/s00449-013-0924-4.

YANG, Y.; SHI, Z.; REHEMAN, A.; JIN, J. W.; LI C.; WANG, Y.; ANDREWS, M. C.; CHEN, P.; ZHU, G.; LING, W.; NI, H. Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037323>

ZAFRILLA, P.; FERRERES, F.; TOMA´S-BARBERA´N, F. A. Effect of Processing and Storage on the Antioxidant Ellagic Acid Derivatives and Flavonoids of Red Raspberry (Rubus idaeus) Jams, **J. Agric. Food Chem**, v. 49, p. 3651-3655, 2001.

ZAUPA, M.; CALANI, L.; DEL RIO, D.; BRIGHENTI, F.; PELLEGRINI, N. Characterization of total antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of differently pigmented rice varieties and their changes during domestic cooking, **Food Chemistry**, v. 187, p. 338-347, 2015.

ZHENG, L.; DU, Y.; ZHANG J. Biobleaching effect of xylanase preparation from an alkalophilic Bacillus sp. on ramie fibers, **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1363-1367, 2000.

ZHAO, X.; ZHU, H.; ZHANG, G. Weidong Tang Effect of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activity of red grape pomace powders, **Powder Technology**, v. 286 p. 838-844, 2015.

ZHANG, Y.; BUTELLI, E.; MARTIN, C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants, **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 81–90, 2014.

ZILIC, S.; KOCADAGLI, T.; VANCETOVIC J.; G€OKMEN V. Effects of baking conditions and dough formulations on phenolic compound stability, antioxidant capacity and color of cookies made from anthocyanin-rich corn flour, **Food Science and Technology**, v. 65, p. 597-603, 2016.

ZORIC, Z.; PELAIC, Z.; PEDISIC, S.; GAROFULIC, I. E.; KOVACEVIC, D. B.; DRAGOVICEUZELAC, V. Effect of storage conditions on phenolic content and antioxidant capacity of spray dried sour cherry powder, **Food Science and Technology**, v. 79, p. 251-259, 2017.

Anexo 1

ANÁLISE SENSORIAL DE PÃES INTEGRAIS ELABORADOS COM FARINHA DE JABUTICABA

1. ***Identificação*:**

Julgador nº: _____ Grupo nº: _____ Sexo: _____

Nome: _____

Idade (anos): _____ Escolaridade: _____ Apresenta alguma doença atualmente? ( ) sim ( ) não

Qual ou quais? _____

Apresenta o estado de saúde alterado por gripe, virose ou alergia nesse momento?

( ) sim ( ) não

É fumante? ( ) sim ( ) não Se sim, quantos cigarros por dia? _____

Usa algum medicamento atualmente: ( ) sim ( ) não

Qual ou quais? _____

2. ***Pesquisa de alergias e intolerâncias*:**

Dentre os itens abaixo, assinale aquele(s) cujo consumo já provocou reação alérgica (vermelhidão, coceira, falta de ar, inchaço) ou intolerância (mal estar, diarreia, vômito, dor abdominal)?

( ) Açúcar mascavo	( ) Farinha de jabuticaba
( ) Farinha de trigo integral	( ) Azeite
( ) Fermento biológico seco	( ) Sal
( ) Farelo de trigo	

3. ***Frequência de consumo de pão de forma integral*:**

( ) Mais de 3 vezes/dia ( ) 2 a 3 vezes/dia ( ) 1 vez/dia

( ) 5 a 6 vezes/semana ( ) 2 a 4 vezes/semana ( ) 1 vez/semana

( ) 1 a 3 vezes/mês ( ) Nunca ou quase nunca

Quando consome, quantas fatias consome por vez? _____

4. ***Escala de apreciação para pão de forma integral*:**

( ) Gosto muitíssimo

( ) Gosto muito

( ) Gosto moderadamente

( ) Gosto ligeiramente

5. ***Treinamento em análise sensorial de alimentos*:**

Você já participou de algum treinamento em análise sensorial de alimentos antes?

( ) sim ( ) não

Agradecemos sua disponibilidade de contribuir para a produção de conhecimento!

Anexo 2

Análise sensorial de pães elaborados de forma integral

LOCAL DO TESTE: Laboratório da Nutrição / UFRJ; sala E-17
DATA: _____ HORÁRIO: _____

Para avaliação sensorial dos pães é necessário cumprir os seguintes itens **no dia combinado acima**:

- Não utilizar aparelho dentário (removível) durante os testes;
- Não consumir alimentos picantes;
- Não fazer uso de cosméticos e perfumes que apresentem odores fortes;
- Se for fumante, não fumar 1 hora antes da análise sensorial;
- Jejum de 1 (uma) a 2 (duas) horas.

Ficha de Avaliação n° 1

Julgador nº: _____ Grupo nº: _____

Você está recebendo amostras codificadas. Por favor, avalie cada uma nos quesitos relacionados abaixo:

1) Avalie o **aspecto global** de cada uma utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(9) gostei extremamente		
(8) gostei moderadamente		
(7) gostei regularmente	_____	( )
(6) gostei ligeiramente		
(5) não gostei, nem desgostei	_____	( )
(4) desgostei ligeiramente		
(3) desgostei regularmente		
(2) desgostei moderadamente		
(1) desgostei extremamente		

2) Avalie o **aroma** de cada uma utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(9) gostei extremamente		
(8) gostei moderadamente		
(7) gostei regularmente	_____	( )
(6) gostei ligeiramente		
(5) não gostei, nem desgostei	_____	( )
(4) desgostei ligeiramente		
(3) desgostei regularmente		
(2) desgostei moderadamente		
(1) desgostei extremamente		

3) Avalie a **cor da casca** de cada uma utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(9) gostei extremamente		
(8) gostei moderadamente		
(7) gostei regularmente	_____	( )
(6) gostei ligeiramente		
(5) não gostei, nem desgostei	_____	( )
(4) desgostei ligeiramente		
(3) desgostei regularmente		
(2) desgostei moderadamente		
(1) desgostei extremamente		

4) Avalie a **cor do miolo** de cada uma utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(9) gostei extremamente		
(8) gostei moderadamente		
(7) gostei regularmente	_____	( )
(6) gostei ligeiramente		
(5) não gostei, nem desgostei	_____	( )
(4) desgostei ligeiramente		
(3) desgostei regularmente		
(2) desgostei moderadamente		
(1) desgostei extremamente		

5) Avalie o **sabor** de cada uma utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(9) gostei extremamente		
(8) gostei moderadamente		
(7) gostei regularmente	_____	( )
(6) gostei ligeiramente		
(5) não gostei, nem desgostei	_____	( )
(4) desgostei ligeiramente		
(3) desgostei regularmente		
(2) desgostei moderadamente		
(1) desgostei extremamente		

6) Avalie a **textura** de cada uma utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(9) gostei extremamente		
(8) gostei moderadamente		
(7) gostei regularmente	_____	( )
(6) gostei ligeiramente		
(5) não gostei, nem desgostei	_____	( )
(4) desgostei ligeiramente		
(3) desgostei regularmente		
(2) desgostei moderadamente		
(1) desgostei extremamente		

7) Avalie o **sabor residual** de cada uma utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(9) gostei extremamente		
(8) gostei moderadamente		
(7) gostei regularmente	_____	( )
(6) gostei ligeiramente		
(5) não gostei, nem desgostei	_____	( )
(4) desgostei ligeiramente		
(3) desgostei regularmente		
(2) desgostei moderadamente		
(1) desgostei extremamente		

Anexo 3

Ficha de Avaliação nº 2

Julgador nº: _____ Grupo nº: _____

1) Você está recebendo duas amostras codificadas, avalie cada uma segundo a sua **intenção de consumo**, utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(7) Comeria sempre	_____	( )
(6) Comeria muito frequentemente		
(5) Comeria frequentemente	_____	( )
(4) Comeria ocasionalmente		
(3) Comeria raramente		
(2) Comeria muito raramente		
(1) Nunca comeria		

2) Avalie cada uma segundo a sua **intenção de compra**, utilizando a escala abaixo.

	Amostra	Nota
(5) Certamente compraria	_____	( )
(4) Provavelmente compraria		
(3) Talvez compraria, talvez não compraria	_____	( )
(2) Provavelmente não compraria		
(1) Certamente não compraria		

Anexo 4

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde – CCS
Instituto de Nutrição Josué de Castro – INJC

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Análise sensorial de pães integrais e elaborados com farinha de jabuticaba

Você está sendo convidado (a) a participar voluntariamente de uma pesquisa cujo objetivo é conhecer a opinião e avaliar se os consumidores gostam de pães de forma adicionados de farinha de jabuticaba. Este estudo é importante para incentivar o consumo de alimentos com grandes quantidades de nutrientes que são considerados positivos para a saúde humana. Este estudo está sendo realizado pela aluna de Mestrado em Nutrição Paula Andrés Duarte sob orientação da Profª Drª Mariana Costa Monteiro.

As condições de inclusão nesse estudo foram criadas com o objetivo de proteger você de eventuais riscos ou problemas. Você só será incluído (a) no estudo se for consumidor (a) habitual de pães (pelo menos 4 dias na semana) e apresentar idade entre 19 e 50 anos.

Você será solicitado a provar os pães de forma e, em seguida, expressar sua opinião respondendo a fichas de avaliação.

Esclarecemos que o procedimento não acarretará em desconfortos ou riscos ao participante, uma vez que o mesmo será excluído (a) ao não se encaixar no perfil do estudo. Caso o (a) participante apresente qualquer tipo de problema ocasionado pelo estudo serão disponibilizadas as devidas medidas para minimizar ou solucionar o problema. Esclarecemos, ainda, que não há benefício direto para o (a) participante, e que você não terá despesas, nem retorno financeiro. Garantimos que poderá ocorrer compensação de despesas que possam existir em função de sua participação no projeto. A recusa na participação da pesquisa não acarretará em nenhum prejuízo. Além disso, você poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem constrangimentos, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou penalização, sem necessidade de justificativa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso à professora Mariana Costa Monteiro. A Profª Mariana Monteiro, responsável pela pesquisa, poderá ser encontrada através dos telefones: (21) 99961-5219 e (21) 3938-6449. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/HUCFF/UFRJ – R. Prof. Rodolpho Paulo Rocco, nº 255 – Cidade Universitária/Ilha do Fundão – Sala 01D-46/1º andar - pelo telefone 3938-2480, de segunda a sexta-feira, das 8 às 15 horas, ou através do email: cep@.hucff.ufrj.br.

Todos os dados fornecidos são considerados confidenciais, sendo totalmente garantidos o sigilo das informações e a sua privacidade. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a sua identificação e os resultados obtidos neste trabalho serão divulgados em revistas científicas da área.

Acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu conversei com a Profª Mariana Monteiro sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar no Hospital Clementino Fraga Filho para eventuais tratamentos se necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

_____ _____ Data: ____/____/____
Nome do Sujeito da Pesquisa Assinatura do Sujeito da Pesquisa

_____ _____ Data: ____/____/____
Nome do Pesquisador Assinatura do Pesquisador