

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

AMANDA NERIS DOS SANTOS

**BIOATIVOS EXTRAÍDOS DA NÊSPERA (*Eriobotrya japonica* Lindl.)
APLICADOS À CONSERVAÇÃO DE LARANJA E SUCO DE LARANJA**

Belo Horizonte

2018

AMANDA NERIS DOS SANTOS

**BIOATIVOS EXTRAÍDOS DA NÊSPERA (*Eriobotrya japonica* Lindl.)
APLICADOS À CONSERVAÇÃO DE LARANJA E SUCO DE LARANJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências de Alimentos.

Orientadora: Camila Argenta Fante

Belo Horizonte

2018

Ficha catalográfica

S237b Santos, Amanda Neris dos.
Bioativos extraídos da nêspera (*Eriobotrya japonica Lindl*) aplicados à conservação de laranja e suco de laranja / Amanda Neris dos Santos – 2018.

100 f.

Orientadora: Camila Argenta Fante.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Antimicrobianos – Teses. 2. Ácido ursólico – Teses. 3. Nêspera – Conservação – Teses. 4. Extratos – Teses. 5. Frutas – Análise – Teses. I. Fante, Camila Argenta. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 664.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

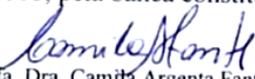
FOLHA DE APROVAÇÃO

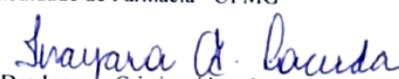
**BIOATIVOS EXTRAÍDOS DA NÊSPERA (*Eriobotrya japonica Lindl.*) APLICADOS
À CONSERVAÇÃO DE LARANJA E SUCO DE LARANJA**

AMANDA NERIS DOS SANTOS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 21 de junho de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Profa. Dra. Camilla Argenta Fante - Orientadora
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Andreza Angelica Ferreira
Faculdade de Farmácia - UFMG

Belo Horizonte, 21 de junho de 2018.

Dedico este trabalho a minha família e aos meus amigos, especialmente ao
Alfredo Rodrigues Alves Silva e a Maria Fátima dos Santos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por proporcionar condições à este estudo.

Agradeço ao Alfredo Rodrigues Alves Silva por todos os momentos desta etapa de nossas vidas, por todo apoio e envolvimento com este trabalho, por estar sempre atento e presente, especialmente pela compreensão e carinho incondicional. Obrigada por acreditar em mim e caminhar junto à esta realidade.

Agradeço a Maria Fátima dos Santos por todo esforço e dedicação aos meus estudos, estando sempre ao meu lado, acreditando e confiando em mim, mas principalmente por me dar o mundo inteiro para voar. Agradeço ao Roberto Neris dos Santos por confiar e se orgulhar deste trabalho.

Agradeço a Camila Argenta Fante por ter acreditado em mim, pela dedicação e auxílio na busca de novos conhecimentos, aprendizados e principalmente por valorizar o que temos de mais importante, uns aos outros. Obrigada pelas oportunidades, convívio, trabalho e amizade.

Agradeço a Viviane Dias Medeiros Silva e ao Victor Luiz Melo Dutra pelo companheirismo de todas as horas, dúvidas, conversas e Ajudas.

Agradeço ao Vanderli Pacheco Da Silva por todo o suporte e empenho ofertado para que este trabalho fosse executado.

Agradeço aos responsáveis, técnicos e alunos dos laboratórios que disponibilizaram equipamentos, reagentes e carinho a este trabalho.

Laboratório Multiusuários _ Dhionne Correia Gomes

Laboratórios de Operações e Tecnologia_ Edna Aparecida De Souza

Laboratório de Análise Sensorial e Estudos de Consumidor _ João Paulo Moreira

Laboratório de Microbiologia de Alimentos _ Ludmila Lizziane De Souza Lima

Laboratório de Bromatologia _ Maria José Cota De Oliveira

Laboratório de Bromatologia _ Ronália Leite Alvarenga

Laboratório de Bromatologia _ Marcos Da Costa Lage

Laboratório de Bioquímica de Alimentos _ Edneia Xavier de Souza

Laboratório Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica _ Marina Franco

Laboratório Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica _ Heloísa Seabra

Laboratório de Microbiologia Clínica _ Daniela Diniz Viana De Brito

Laboratório de Microbiologia Clínica _ Mateus Sá Magalhães

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais a possibilidade de realizar este estudo, por um trabalho árduo de todos.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIÇÕES	14
RESUMO	15
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Objetivo geral	22
1.1.1 Objetivos Específicos	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1.1 Nêspera	23
2.1.2 Compostos Bioativos	24
2.1.3 Antimicrobianos	27
2.1.4 Laranja e Suco de Laranja	28
2.1.5 Análise Sensorial por Técnicas Descritivas	30
2.1.5.1 Pivot Profile	31
2.1.5.2 Projective Mapping	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Material	34
3.2 Métodos	35
3.2.1 Extrato	35
3.2.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de nêspera	36
3.2.1.2 Determinação de compostos bioativos dos extratos de nêspera	36
3.2.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de nêspera	37
3.2.2 Aplicação do extrato no recobrimento das laranjas	38
3.2.2.1 Análise colorimétrica	38
3.2.2.2 Perda Mássica	39
3.2.2.3 Propriedades mecânicas	40
3.2.2.4 Análise sensorial das laranjas	41
3.2.3 Aplicação do extrato no suco de laranja	43
3.2.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais nos sucos de laranja	44
3.2.3.2 Determinação de compostos bioativos nos sucos de laranja	44

3.2.3.3	Sólidos solúveis _____	45
3.2.3.4	Acidez titulável _____	45
3.2.3.5	Ratio _____	45
3.2.3.6	Açúcares totais _____	46
3.2.3.7	Atividade de água _____	46
3.2.3.8	Determinação do potencial hidrogeniônico _____	46
3.2.3.9	Avaliação microbiológica dos sucos de laranja _____	46
3.2.3.9.1	Coliformes totais e termotolerantes _____	47
3.2.3.9.2	Salmonella spp. _____	48
3.2.3.9.3	Contagem total de bolores e leveduras _____	48
3.2.3.10	Análise sensorial dos sucos de laranja _____	49
3.2.4	Análise estatística _____	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	53
4.1	Extrato _____	53
4.1.1	Compostos fenólicos dos extratos por Folin-Ciocalteu _____	53
4.1.2	Compostos bioativos dos extratos por UPLC _____	55
4.1.3	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de nêspera _____	56
4.2	Análises das Laranjas _____	59
4.2.1	Análise Colorimétrica _____	59
4.2.2	Perda mássica _____	61
4.2.3	Propriedades mecânicas _____	62
4.2.4	Análise sensorial _____	63
4.2.4.1	Painelistas _____	63
4.2.4.2	Treinamento _____	63
4.2.4.3	Análise descritiva quantitativa das laranjas _____	64
4.3	Análises dos Sucos de Laranja _____	67
4.3.1	Compostos Fenólicos totais _____	67
4.3.2	Concentração de ácido ursólico _____	68
4.3.3	Ratio _____	71
4.3.4	Açúcares totais _____	73
4.3.5	Atividade de água _____	74
4.3.6	Potencial hidrogeniônico _____	75
4.3.7	Avaliação microbiológica _____	76
4.3.7.1	Coliformes totais e termotolerantes _____	76
4.3.7.2	Salmonella spp. _____	77
4.3.7.3	Contagem total de bolores e leveduras _____	78

4.3.8	Análise sensorial dos sucos de laranja	79
4.3.8.1	Treinamento	79
4.3.8.2	Pivot Profile dos sucos de laranja	81
4.3.8.3	Projective Mapping dos sucos de laranja	83
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Imagem 1 - Nêspera</i>	23
<i>Imagem 2 - Fórmula estrutural do ácido ursólico</i>	25
<i>Imagem 4 - Alocação das laranjas nas caixas</i>	42
<i>Imagem 5 - Apresentação de amostras, Pivot Profile (a) e Projective Mapping (b)</i>	50
<i>Imagem 6 - Apresentação dos limiares aos painelistas</i>	80
<i>Gráfico 1 - Perfil cromatográfico do ácido ursólico</i>	55
<i>Gráfico 2 - Perfil cromatográfico dos extratos</i>	56
<i>Gráfico 4 - Gradiente pelo catálogo de cores cítricas nos lotes</i>	60
<i>Gráfico 6 - Análise de componentes principais da análise ADQ das Laranjas</i>	65
<i>Gráfico 7 - Perfil cromatográfico dos sucos</i>	69
<i>Gráfico 8 - Análise de correspondência bidimensional, Pivot Profile</i>	82
<i>Gráfico 9 - Coordenadas dos pontos projetados, Projective Mapping</i>	84
<i>Gráfico 10 - Análise fatorial múltipla, Projective Mapping</i>	85

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Valores de fenólicos totais em diferentes partes da nêspera encontrados na literatura</i>	26
<i>Tabela 5 - Formulário da análise de cor</i>	39
<i>Tabela 6 - Formulário de propriedades mecânicas</i>	40
<i>Tabela 7 - Fórmula para o cálculo do Ratio</i>	45
<i>Tabela 8 - Fórmula das unidades formadoras de colônia por mililitro</i>	49
<i>Tabela 9 - Concentração de fenólicos totais nos extratos</i>	53
<i>Tabela 10 - Parâmetros de cor das laranjas</i>	59
<i>Tabela 11 - Média da perda mássica nos lotes de laranja</i>	61
<i>Tabela 12 - Propriedades mecânicas das laranjas</i>	62
<i>Tabela 13 - Fenólicos totais nos sucos</i>	67
<i>Tabela 14 - Concentração de ácido ursólico nos sucos de laranja</i>	70
<i>Tabela 15 - Interação analítica ao Ratio</i>	72
<i>Tabela 16 - Açúcares totais em sucos de laranja</i>	73
<i>Tabela 17 - Atividade de água a_w em sucos de laranja</i>	74
<i>Tabela 18 - Potencial hidrogeniônico - pH</i>	75
<i>Tabela 23 - Limiares máximos e mínimos dos termos descritores</i>	80

LISTA DE ABREVIações

ABD	-	Agar Batata Dextrose
ANVISA	-	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
aW	-	Atividade de água
CA	-	Análise de Correspondência
CMH	-	Muller-Hinton
DNP	-	Desenvolvimento de novo produto
DTAs	-	Doenças Transmitidas por Alimentos
H_0	-	Hipótese de nulidade
HE	-	Ágar Entérico de Hecktoen
LASEC	-	Laboratório de Análise Sensorial e do Consumidor
LST	-	Lauril Sulfato Triptose
MIC	-	Concentração inibitória mínima
$N.m^{-2}$	-	Newton por metro quadrado
Pa	-	Pascal
ppm	-	Partes por milhão
RDC	-	Resolução da diretoria colegiada
ROS	-	Espécies reativas de oxigênio - ROS
RSV	-	Rappaport Vassiliadis Soy
SC	-	Caldo selenito cistina
TT	-	Caldo tetratonato
UPLC	-	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
VB	-	Verde Brilhante Bile
XLD	-	Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

RESUMO

A nêspira (*Eriobotrya japonica* Lindl.) é uma fruta que apresenta em sua constituição química ácidos que atuam como antimicrobianos. Entre eles, o ácido ursólico é estudado enquanto presente na fruta e como ácido triterpênico isolado. Há relação do consumo da nêspira com a saúde humana e ao adicionar estes compostos à formulação de produtos alimentícios é vislumbrado melhorias aos produtos industrializados. Por apresentar baixa toxicidade o ácido ursólico pode ser introduzido em uma matriz alimentar de consumo constante, não apenas por ter característica de conservador orgânico, mas também por seus benefícios a saúde como hepatoprotetora e proteção cardiovascular, característica anti-hiperlipidêmica, antitumorais e antidiabética, anti-inflamatória e efeitos antienvhecimento. o objetivo foi verificar o potencial antimicrobiano do extrato de nêspira e avaliar parâmetros de qualidade e sensoriais das laranjas e dos sucos de laranja com a aplicação do extrato. Foram realizadas, nas laranjas, análise colorimétrica, perda mássica, propriedades mecânicas e análise sensorial descritiva clássica; no extrato foram determinados os compostos bioativos e a concentração inibitória mínima; nos sucos de laranja foram realizadas análises de compostos bioativos, parâmetros de qualidade e sensorial por *Pivot Profile* e *Projective Mapping*. O extrato da “polpa”, “polpa e semente” e “semente” da nêspira permaneceram diluídos em água e foram armazenados a -20 °C. Em análise de concentração inibitória mínima identificou ação antimicrobiana em 1,66 % de concentração do extrato contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e de 3,33 % contra *Escherichia coli* ATCC 35218. O extrato de nêspira selecionado foi adicionado no recobrimento de laranja e no processamento de suco de laranja nas concentrações de 0, 2,5 e 5 % de extrato. Nas laranjas as análises de cor, perda mássica e propriedades mecânicas não evidenciaram diferença entre os lotes avaliados. Os compostos bioativos no extrato e nos sucos foram determinados por Folin-Ciocalteu e UPLC; no suco, as análises de sólidos solúveis e acidez titulável evidenciaram que o ratio das amostras com adição de extrato não apresentaram características palatáveis ideais, foi observada que a proporção de água livre no meio reacional do suco de laranja com a maior concentração de extrato permaneceu estável. Em análise microbiológica nos sucos de laranja, houve ausência de coliformes totais e termotolerantes, de *Salmonella spp.* e bolores e leveduras. A análise sensorial dos sucos de laranja por *Pivot Profile*

apresentou maior impacto aos termos descritores amargo, essência e ácido e pela técnica de *Projective Mapping* confirmou que o extrato é percebível nas concentrações de 2,5 % e 5 %, no entanto, a concentração de 1 % apresentou direcionamento vetorial às amostras de suco puro. Este estudo é pioneiro e a aplicação de 2,5 % de extrato da semente da nêspera no suco de laranja evidenciou o potencial antimicrobiano em uma matriz alimentar, além da possibilidade de aplicação do extrato hidro-etanólico da semente da nêspera em uma matriz alimentar pela similaridade sensorial entre a amostra com 1 % de extrato e as amostras de suco de laranja integral.

Palavras-chave: Antimicrobiano. Ácido Ursólico. Nêspera.

ABSTRACT

The loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) is a fruit which has in its chemical constitution acids that act as antimicrobials. Among them, ursolic acid is studied while present in the fruit and as isolated triterpenic acid. There is a relation between the consumption of loquat and human health, and adding these compounds to the formulation of food products reveals improvements to industrialized products. Due to its low toxicity, ursolic acid can be introduced into a constant consumption food matrix, not only because it has the characteristic of an organic preservative, but also because of its health benefits such as hepatoprotective and cardiovascular protection, anti-hyperlipidemic, antitumor and antidiabetic, anti inflammatory and antiaging effects. The objective of this study was to verify the antimicrobial potential of the loquat extract and to evaluate quality and sensorial parameters of oranges and orange juices with the application of the extract. Colorimetric analysis, mass loss, mechanical properties and classical descriptive sensory analysis were performed in the oranges; in the extract the bioactive compounds and the minimal inhibitory concentration were determined; the orange juices were analyzed for bioactive compounds, quality and sensory parameters by Pivot Profile and Projective Mapping. The pulp, pulp and seed and seed extract from the loquat remained diluted in water and stored at -20 ° C. The minimum inhibitory concentration analysis identified an antimicrobial action in 1.66% extract concentration against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and 3.33% against *Escherichia coli* ATCC 35218. The selected loquat extract was added in the orange coating and in the processing of orange juice at concentrations of 0, 2.5 and 5% extract. In the oranges, the analysis of color, weight loss and mechanical properties showed no difference between the lots that were evaluated. Bioactive compounds in the extract and juices were determined by Folin-Ciocalteu and UPLC; in the juice, analyzes of soluble solids and titratable acidity showed that the ratio of samples with addition of extract did not present ideal palatable characteristics, it was observed that the proportion of free water in the reaction environment of orange juice with the highest concentration of extract remained stable. In microbiological analysis in orange juice, there were no total and thermotolerant coliforms of *Salmonella* spp. and molds and yeasts. The sensory analysis of orange juice by Pivot Profile showed a greater impact on the descriptors bitter, essence and acid, and the technique of

Projective Mapping confirmed that the extract is perceptible at concentrations of 2.5% and 5%, however, the concentration of 1% showed vector direction to pure juice samples. This study is a pioneer and the application of 2.5% of seed extract in orange juice showed that the antimicrobial potential in a food matrix, besides the possibility of application of the hydroethanolic extract of the loquat seed in a food matrix by similarity between the sample with 1% of extract and the samples of integral orange juice.

Key words: Antimicrobial. Ursolic Acid. Medlar.

1 INTRODUÇÃO

Alimentos são fontes de nutrientes e quando combinados, podem formar interações benéficas ao produto e ao organismo humano. A nêspera (*Eriobotrya japonica* Lindl.) é um fruto que apresenta em sua constituição ácidos que se comportam como compostos antimicrobianos. Estes compostos são estudados enquanto presentes na fruta e como ácidos triterpênicos isolados, apresentando relação do consumo com a saúde humana e melhorias aos produtos alimentícios industrializados (Koba *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2011; Ercisli *et al.*, 2012; Hong-Xia *et al.*, 2014; Delfanian, Kenari, *et al.*, 2015; Kammoun *et al.*, 2015; Yilong, 2016).

São vários os compostos bioativos já encontrados em extratos de nêspera e incluem neste grupo os ácidos triterpênicos oleanólico, ursólico, α -hidroxioleanólico, arjunólico e euscápico, e os ácidos fenólicos clorogênico, catequínico, hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico, elágico e o o-cumárico (Kim *et al.*, 2011; Hong-Xia *et al.*, 2014; Yilong, 2016). Sáez *et al.*, 2010, observaram que estes compostos podem equilibrar ou intensificar a característica antimicrobiana do fruto, no entanto, não há estudos que evidenciam a interação entre os compostos bioativos extraídos da nêspera de forma conjunta ou um composto isolado, adicionado em um alimento.

A conservação de alimentos industrializados por extrato de planta é observada de forma positiva pelo mercado consumidor, o que possibilita a busca e estudos por extratos orgânicos como os da nêspera (Ercisli *et al.*, 2012; Delfanian, Kenari e Sahari, 2015b). Compostos orgânicos utilizados para conservação de alimentos estão em ascensão, visto que, a produção industrial de alimentação humana busca novos mercados, com produtos que atendam a segurança alimentar, amplitude logística e sabores agradáveis (Aminlari *et al.*, 2014; Fi, 2016).

Em frutas e hortaliças, outros ácidos orgânicos são testados como antimicrobianos naturais em alface, foram utilizados ácidos orgânicos da Citrosan® em *E.coli* e *Salmonella spp* (Gómez Álvarez, 2012), no recobrimento de alface e espinafre pelo uso de extrato de semente de uva (Ganesh *et al.*, 2012) e tangerinas e morangos foram aspergidas com ácido tânico complexado ao ferro III que apresenta a estrutura de um nanofilme antimicrobiano (Park *et al.*, 2017).

O extrato de nêspera apresenta características antimicrobianas e inúmeras propriedades benéficas ao organismo humano, no entanto, não há relatos literários sobre sua aplicação em produto alimentício (López-Hortas *et al.*, 2018).

Por apresentar baixa toxicidade (Kashyap *et al.*, 2016), o ácido ursólico pode ser introduzido em uma matriz alimentar de consumo constante, não apenas por apresentar a característica de conservador orgânico, mas também por seus benefícios à saúde como hepatoprotetora e proteção cardiovascular (Wozniak *et al.*, 2015), característica anti-hiperlipidêmicos (Zhang *et al.*, 2016), antitumorais e quimiopreventivas (Shanmugam *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2014), antidiabética (Jang *et al.*, 2009), antiinflamatória e efeitos antienvhecimento (López-Hortas *et al.*, 2018).

Figueira *et al.*, (2010) evidenciam que a laranja e seu suco apresentam pouca restrição, ampla aceitação e o Brasil, segundo a Conab, (2017), detém posição de maior produtor mundial de laranjas. Por estes motivos, estas foram as matrizes alimentares escolhidas para testar o potencial antimicrobiano do extrato da nêspera.

Análises sensoriais em alimentos podem ser requeridas para o desenvolvimento de novos produtos, manutenção de qualidade de processos produtivos e acesso de produtos a novos mercados consumidores (Araujo, 2010; Holanda *et al.*, 2015). Esta é uma ciência multidisciplinar que possibilita a avaliação por sensores corporais que se estabelecem por interações químicas, físicas e neurais. É possível delinear fatores químicos e físicos e as interações entre estes por técnicas instrumentais, porém os fatores que correlacionam as memórias sensoriais aos atributos de uma amostra podem ser acessados apenas por um organismo humano (Amaral, 2014).

Por correlacionar sensações aos atributos de um alimento, as técnicas analíticas devem ser selecionadas e aplicadas em um estudo de forma a direcionar as avaliações e minimizar os interferentes. Evoluções nas análises sensoriais são fundamentadas em técnicas advindas da psicologia que utilizam ferramentas como a categorização e a formulação cognitiva (Valentin e Nestrud, 2016).

Os testes descritivos detêm a liberdade métrica e para direcionar ao objetivo de um estudo as instruções de realização das análises devem ser inequívocas. Além do direcionamento analítico, é necessária a observação aos participantes, pois em um

teste em que painelistas são convidados a acessar memórias, relaciona-las aos atributos de um alimento e direcionar uma resposta, qualquer alteração poderá ser um interferente analítico (Chollet *et al.*, 2011; Thuillier *et al.*, 2015; Valentin e Nestrud, 2016)

Para verificação a ação dos compostos bioativos extraídos da nêspira quanto ao potencial antimicrobiano foi proposto à inclusão do extrato que apresentar maior concentração de compostos fenólicos, ácido ursólico e efeito antimicrobiano, dentre os extratos da “polpa de nêspira”, da “semente de nêspira” ou da “polpa e semente de nêspira”, ao processamento de suco de laranja e no recobrimento de laranjas. A análise sensorial verificará as características visuais e de textura das laranjas recobertas com concentrações distintas do extrato e a percepção palatável das diferentes concentrações do extrato adicionado no suco.

1.1 Objetivo geral

Verificar o potencial antimicrobiano do extrato de nêspera e avaliar parâmetros de qualidade e sensoriais das laranjas e dos sucos de laranja com a aplicação do extrato.

1.1.1 Objetivos Específicos

Extrair os compostos bioativos da “polpa”, da “polpa e semente” e da semente de nêspera;

Analisar a concentração inibitória mínima do extrato de nêspera frente aos microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 35218, em alimentos;

Analisar por parâmetros de identidade e qualidade, os sucos de laranja com e sem adição do extrato de nêspera;

Verificar o efeito antimicrobiano do extrato de nêspera adicionado no recobrimento de laranjas e no suco de laranja.

Avaliar sensorialmente de forma descritiva as laranjas recobertas com extrato de nêspera;

Elaborar sucos de laranja adicionados com extrato de nêspera e analisá-los sensorialmente pelos testes descritivos *Pivot Profile* e *Projective Mapping*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Nêspera

A nêspera (*Eriobotrya japonica* Lindl.) é um fruto que tem o nome científico dado pela união das palavras gregas erion (lã) e botrys (cachos). Esta fruta, apresentada na Imagem 1 é do tipo pomo, pertencente à família Rosaceae e sua origem é asiática (Cha *et al.*, 2011). Os frutos são ovais, com o epicarpo de textura aveludada e coloração amarelo laranjada. Os seus frutos são geralmente consumidos como fruta fresca e a polpa é suculenta e seu sabor altera de doce para subácido ou ácido (Ercisli *et al.*, 2012).

São várias as espécies de nêspera existentes e a divisão mais característica dentre estas espécies se dá com relação ao armazenamento de caroteno na polpa que é o principal pigmento da nêspera. Esta característica origina dois grupos, os que têm capacidade de desenvolver estruturas normais de cromoplastos e os que não têm esta capacidade, no entanto, ambos apresentam suculência, textura firme no mesocarpo e aveludada no epicarpo (Zhou *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2011; Ercisli *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2012; Hong-Xia *et al.*, 2014; Iac, 2015; Yilong, 2016).

Imagem 1 - Nêspera



Fonte: Acervo próprio

A China é o maior produtor mundial deste fruto (Delfanian, Kenari e Sahari, 2015b; Yilong, 2016), e em toda região asiática é utilizada como planta medicinal, onde as

cascas da árvore, as folhas, sementes e polpa recebem destinação específica aos tratamentos de saúde (Kim *et al.*, 2011). No entanto, esta espécie também é cultivada em diversos países, principalmente em regiões subtropicais, como o Brasil (Hong-Xia *et al.*, 2014; Rao e Tang, 2017). Os frutos são consumidos principalmente na forma fresca, mas em escala doméstica também são utilizados na elaboração de bolos, tortas, geléias, compotas e chutney (Koba *et al.*, 2007; Ercisli *et al.*, 2012).

A nêpera tem em sua composição açúcares, ácidos orgânicos, carotenoides, vitaminas, compostos bioativos e minerais (Ercisli *et al.*, 2012; Yilong, 2016). Os compostos bioativos já encontrados na nêpera apresentam propriedade anti-inflamatória, antidiabética, antiproliferativa, antioxidante, antiviral, função neuroprotetora, ação inseticida e antimicrobiana (Kim *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2011; Kim, *et al.*, 2011; Gentile *et al.*, 2016; Yilong, 2016; Rao e Tang, 2017).

O ácido ursólico conjuntamente ao ácido oleanólico são os bioativos de destaque na composição química da nêpera, estes dois ácidos são isômeros com propriedades antimicrobianas.

O ácido ursólico é um composto bioativo de destaque neste fruto, mas, ainda não foi estudado enquanto aplicado em alimentos ou quanto as suas características sensoriais (Kim *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2011; Kim, *et al.*, 2011; Ercisli *et al.*, 2012; Gentile *et al.*, 2016; Yilong, 2016; Rao e Tang, 2017; López-Hortas *et al.*, 2018).

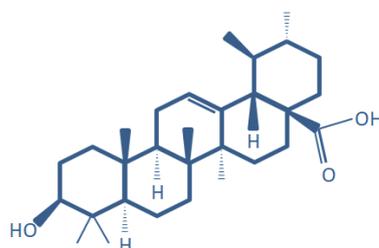
2.1.2 Compostos Bioativos

Plantas classificadas com características bioativas apresentam significativa quantidade de metabólitos secundários que atuam como neutralizadores de espécies reativas de oxigênio – ROS (Ercisli *et al.*, 2012).

O conteúdo bioativo já encontrado na nêpera é referente aos flavonoides, carotenoides, fenólicos, tocoferóis e ácido ascórbico. E a concentração dos compostos bioativos apresenta variação de acordo com a parte do fruto, cultivares, fatores genéticos e ambientais, no entanto, a nêpera pode ser considerada fonte de flavonoides e carotenoides, tendo a semente maior representatividade aos bioativos (Ercisli *et al.*, 2012; Delfanian, Kenari e Sahari, 2015a).

Dentre os bioativos já encontrados na nêspera o ácido ursólico (3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oic-acid) que é um ácido orgânico, triterpênico monohidroxilado de fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃, e fórmula estrutural correspondente a Imagem 2, está geralmente associado ao ácido oleanólico (3 β -hidroxi-olea-12-en-28-oic-acid), e ambos são amplamente encontrados em vegetais. Estes ácidos isômeros, podem ser extraídos do vegetal por solventes orgânicos metanol e etanol ou pelo inorgânico, água (Kim *et al.*, 2005; Koba *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013; Rashed e Butnariu, 2014; Delfanian, Kenari, *et al.*, 2015; Delfanian, Kenari e Sahari, 2015b).

Imagem 2 - Fórmula estrutural do ácido ursólico



Fonte: López-Hortas *et al.*, (2018)

O ácido ursólico extraído da nêspera é um composto bioativo com propriedades antimicrobianas e está presente no fruto, que é a porção comestível da planta (Perez G *et al.*, 1998; Palombo e Semple, 2001; Roula *et al.*, 2010; Abdou *et al.*, 2011; Li, 2011; Sultana, 2011; Xu e Chen, 2011; Wu *et al.*, 2013; Rashed e Butnariu, 2014; Bobis *et al.*, 2015; Wozniak *et al.*, 2015; López-Hortas *et al.*, 2018).

Para a reação antimicrobiana do ácido ursólico é necessário a presença de hidroxilas livres e grupos carboxilas, no entanto, a baixa solubilidade em água dificulta a miscibilidade deste composto em um alimento, assim as técnicas de extração são desenvolvidas com o intuito de proporcionar ao composto maior solubilidade em meio aquoso (Sultana, 2011; Eloy *et al.*, 2012).

A metodologia padrão para a identificação dos compostos fenólicos totais é a metodologia por reagente de Folin-Ciocalteu resulta em um valor que representa, não apenas os compostos fenólicos, mas todos os compostos com a característica química de redução (Granato e Nunes, 2016; Chen *et al.*, 2017). A Tabela 1

apresenta os valores de fenólicos totais encontrados no extrato de partes ou no fruto inteiro da nêspera em base metanólica, hídrica, etanólica ou hidro-etanólica.

Tabela 1 - Valores de fenólicos totais em diferentes partes da nêspera encontrados na literatura

Solução de extração	Parte da nêspera	$\mu\text{g GAE.mL}^{-1}$	Autoria
Etanol	Exocarpo	$664,53 \pm 2,59$	(Delfanian, Kenari e Sahare, 2015)
Etanol	Exocarpo	≈ 100	(Koba <i>et al.</i> , 2007)
Etanol	Carpo	≈ 50	(Koba <i>et al.</i> , 2007)
Etanol	Carpo	$249,96 \pm 2,1$	(Delfanian, Kenari e Sahare, 2015)
Etanol	Endocarpo	≈ 300	(Koba <i>et al.</i> , 2007)
Etanol	Fruto inteiro	$664,53 \pm 2,59$	(Delfanian, Kenari e Sahari, 2015a)
Etanol-água	Exocarpo	$879,54 \pm 3,91$	(Delfanian, Kenari e Sahare, 2015)
Etanol-água	Carpo	$387,69 \pm 2,60$	(Delfanian, Kenari e Sahare, 2015)
Água	Exocarpo	≈ 100	(Koba <i>et al.</i> , 2007)
Água	Carpo	≈ 20	(Koba <i>et al.</i> , 2007)
Água	Endocarpo	≈ 50	(Koba <i>et al.</i> , 2007)
Água	Exocarpo	$272,51 \pm 2,19$	(Delfanian, Kenari e Sahare, 2015)
Água	Carpo	$147,39 \pm 0,81$	(Delfanian, Kenari e Sahare, 2015)
Metanol	Fruto inteiro	$257,1 \pm 0,73$ $664,7 \pm 1,27$	(Gentile <i>et al.</i> , 2016)

Os bioativos da nêspera também podem ser identificados pela capacidade de redução total dos fenólicos e a concentração destes compostos pode ser mensurada por cromatografia líquida de ultra performance - UPLC (Koba *et al.*, 2007; Ercisli *et al.*, 2012; Delfanian, Kenari e Sahare, 2015; Delfanian, Kenari e Sahari, 2015a).

Por UPLC é possível quantificar o ácido ursólico usando uma coluna de vidro com um polímero finamente preparado e um solvente que flui, por gravidade, juntamente com a amostra pela coluna, sendo assim, é possível separá-la por diferentes espectros. Para quantificação do ácido ursólico da nêspera por UPLC, Wu *et al.*, (2013) utilizaram o comprimento de onda em 210 nanômetros. De 200 a 215 nanômetros usando como fase móvel acetonitrila e água, é possível detectar em UPLC por ultravioleta – (UV) os compostos orgânicos presentes nos extrato das partes da nêspera (Snyder *et al.*, 2010).

2.1.3 Antimicrobianos

Uma grande variedade de plantas é pesquisada com relação à propriedade antimicrobiana e seus correlatos mecanismos de ação. O principal incentivador à busca de novos compostos é principalmente a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos já descobertos (Abdou *et al.*, 2011; Lewis, 2017).

Os antimicrobianos apresentam mecanismo de ação pela interação do agente com a membrana celular, causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares (Branco *et al.*, 2017); pela inativação de enzimas, geralmente envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; e pela destruição ou inativação funcional do material genético do microrganismo (Branco *et al.*, 2017; Lewis, 2017)

A atividade antimicrobiana da nêspera está relacionada aos metabólitos secundários que geram substâncias de baixo peso molecular, como os glicosídeos saponosídicos do tipo triterpênicos, que atuam no microrganismo causando alterações destrutivas (Abdou *et al.*, 2011; Arambarri e Hernández, 2014).

Quando se trata de um composto reativo de origem orgânica, a ação pode ter influência de outros fatores do meio reacional, como a composição química, a complexidade e propriedades químicas do alimento ou mesmo com relação à estrutura e a composição química dos microrganismos (Juneja *et al.*, 2012).

As bactérias gram-negativas são microrganismos que apresentam resistência à compostos antibióticos tradicionalmente usuais. Dentre esses, *E. coli* é considerado um microrganismo indicador de condições higiênico-sanitário de processo produtivo de alimentos por sua origem fecal (Juneja *et al.*, 2012).

Estudos verificaram que extrato vegetal com característica antimicrobiana apresenta considerável ação contra as bactérias gram-positivas, não sendo as gram-negativas igualmente afetadas devido a resistência da membrana aos interferentes extrínsecos. No entanto, diferentes estudos indicam que os ácidos ursólico e o oleanólico, extraídos da nêspera, apresentaram relevante ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Palombo e Semple, 2001; Roula *et al.*, 2010; Abdou *et al.*, 2011; Bobis *et al.*, 2015).

2.1.4 Laranja e Suco de Laranja

O Brasil é líder mundial na produção de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck) e 40 % do total das laranjas produzidas no mundo são destinadas à produção de suco concentrado (Okino-Delgado e Fleuri, 2014). A laranja é um fruto cítrico do tipo baga, denominado hesperídio, de origem asiática com as principais características sensoriais delineadas por suculência, doçura e acidez (Almeida, 2013). O epicarpo do fruto, também denominado de flavedo, tem em sua constituição carotenoides, responsáveis pela coloração amarela alaranjado da fruta e limoneno, óleo essencial que proporciona odores e sabores característicos à laranja (Bier *et al.*, 2017; Torres Alvarez *et al.*, 2017). Parâmetros sensoriais da fruta são importantes ao consumidor que relaciona as características externas como a cor, o formato, casca rugosa, lisa ou brilhante aos atributos internos esperados. No entanto, o índice de maturação definido pela variação de cor, de verde para amarelo é o parâmetro de maior representatividade na escolha, geralmente relacionada ao frescor e ao valor nutricional (Singh *et al.*, 2017).

A laranja pode sofrer injúrias causadas pela proliferação de fungos e pela maturação natural do fruto. Tais alterações comprometem a comercialização da fruta e carrega problemas à indústria de alimentos ao processar produtos derivados, uma vez que, para eliminar os esporos destes microrganismos são necessários tratamentos específicos e cuidados adicionais (Nienaber e Shellhammer, 2001; Bevilacqua *et al.*, 2013).

Com o intuito de minimizar a deterioração fúngica, alguns antimicrobianos orgânicos são estudados para que o período pós-colheita seja prolongado (Ganesh *et al.*, 2012; Gruber *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2017).

O suco mais consumido no mercado mundial é o de laranja devido às propriedades sensoriais, principalmente de cor e sabor, e por seu valor nutricional. Esta bebida é fonte de ácido ascórbico, carotenoides, tiamina, folato e flavanonas como a hesperidina e naringina (Morand *et al.*, 2011; Stinco *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2014). O consumo de sucos de frutas é crescente, e quando comparado o consumo de suco com o consumo da fruta, há vantagens com relação à facilidade da ingestão e o período útil do produto (Stinco *et al.*, 2012; Conab, 2017).

Na indústria de sucos de frutas, o suco de laranja teve destaque mundial e na década de 90, quando o Brasil apresentou novas formas de comercialização do produto e o mercado do suco de laranja se tornou internacionalmente competitivo (Silva e Fonseca, 1999).

O suco de laranja apresenta características específicas ao olfato, tato, visão e paladar. Tais características podem sofrer alterações no decorrer do tempo em produtos processados, sendo as principais alterações provenientes dos processos tecnológicos e dos microrganismos (Silva e Fonseca, 1999).

A legislação brasileira define como suco, “uma bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetido a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo” (Brasil, 1994).

O Padrão de Identidade e Qualidade - PIQ do suco de laranja é definido pela Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA que estabelece as concentrações máximas e mínimas da composição. No PIQ de suco de laranja é permitido apenas a utilização de laranjas, no entanto, a ANVISA autoriza a adição de ingredientes como aditivos alimentares de função conservadora, antioxidante e estabilizante (Anvisa; Brasil, 2000). O ácido ascórbico é um composto bioativo orgânico que pode ser adicionado aos sucos com a informação adicionado de vitamina C expressa no rótulo, esta adição apresenta melhorias tecnológicas como a conservação do produto e funcionalidade ao organismo humano (Brasil, 2016). Neste contexto, a nêspera contribui ao desenvolvimento de novos estudos por seus compostos bioativos apresentarem potencial antimicrobiano, conferindo assim a função conservadora e funcional ao alimento processado.

Assim, a imersão das laranjas em diferentes concentrações do extrato de nêspera selecionado, pode ser uma alternativa para aumentar o período pós-colheita de laranjas e para verificar esta possibilidade foi proposto a realização de análises físicas e a análise sensorial por técnica descritiva quantitativa – ADQ Clássico (Amyotte *et al.*, 2017).

Já para verificar a interação palatável do extrato de nêspera selecionado, com o suco de laranja foram propostas análises físicas, químicas e as técnicas sensoriais descritivas por *Pivot Profile* e *Projective Mapping* (Thuillier *et al.*, 2015; Balthazar *et al.*, 2017; Esmerino *et al.*, 2017; Deneulin *et al.*, 2018; Marcelo *et al.*, 2018)

2.1.5 Análise Sensorial por Técnicas Descritivas

A análise descritiva quantitativa - ADQ, idealizada por Stone *et al.*, (1974) e o perfil sensorial referenciado inicialmente por Amerine *et al.*, (1965); Williems e Carter, (1977); Powers, (1984); Risvik, (1985); Stone e Sidel, (1985) trouxeram à análise sensorial uma óptica ampliada e conjunta dos sensores humanos. A partir deste marco, a análise sensorial pode ser descrita correlacionando as características e intensidades percebíveis por um organismo específico e não apenas por um padrão pré-estabelecido. Assim, os atributos identificados por cada painalista não são necessariamente iguais, mas tendem a apresentar um eixo lógico matricial (Amerine *et al.*, 1965; Stone *et al.*, 1974; Stones *et al.*, 1974; Williams e Carter, 1977; Powers, 1984; Risvik, 1985; Stone e Sidel., 1985; Corollaro *et al.*, 2013).

Para o recrutamento dos voluntários é desejável que os mesmos tenham interesse ao alimento e disponibilidade à realização das análises. Por sua vez, a seleção dos voluntários ao grupo de painelistas deve ser delineada pela acuidade dos participantes aos atributos percebíveis na amostra (Chollet *et al.*, 2011; Thuillier *et al.*, 2015; Valentin e Nestrud, 2016; Amyotte *et al.*, 2017)

Os treinamentos para análises descritivas são modificados para melhoria das técnicas, pois quando embasados nos protocolos clássicos são demorados e apresentam custo elevado. Paralelamente são realizados treinamentos não convencionais, também denominados por treinamentos descritivos rápidos, onde, os atributos percebíveis no produto são apresentados aos painelistas por limiares máximos e mínimos, instantes antes, da realização da técnica (Thuillier *et al.*, 2015).

A etapa de tabulação de respostas, em ADQ é específica e demanda conhecimentos extremos do produto analisado e dos painelistas para que o eixo lógico seja estabelecido. Quando se trata do conhecimento dos painelistas, o treinamento é a

etapa crucial, pois, é nesta que estabelece os limiares de percepção e as posturas analíticas de cada integrante (Meilgaard *et al.*, 1987).

A tabulação de respostas de análises descritivas apresenta uma das dificuldades na distinção de termos que caracterizam um mesmo atributo, assim, é necessário o direcionamento das palavras levantadas pelo grupo de painelistas aos respectivos radicais, tornando estas palavras em termos descritores, esta etapa é também chamada de lematização ou categorização. Com a identificação dos termos descritores, é desenvolvido o léxico causal do painel, ou seja, qual a intensidade máxima e mínima percebível de cada termo descritor por um determinado painel sensorial. Apesar de ser específico, o léxico causal tem a finalidade de estabelecer métrica às respostas e não especificidade ao painel (Corollaro *et al.*, 2013; Thuillier *et al.*, 2015; Deneulin *et al.*, 2018).

Com a evolução das técnicas descritivas, o treinamento do painel e a tabulação dos resultados se tornaram mais eficientes, assim houve uma ampliação de possibilidades aos métodos analíticos descritivos. Tendo como ponto imutável a liberdade do painalista em opinar de forma ampla sobre quaisquer pontos que julgar pertinente foram desenvolvidas as técnicas sensoriais avançadas (Stone *et al.*, 1974; Meilgaard *et al.*, 1987; Silva *et al.*, 2010; Deneulin *et al.*, 2018)

A *Pivot Profile* (Thuillier, 2007) e a *Projective Mapping* (Risvik *et al.*, 1994) são técnicas advinda do ADQ clássico, com alterações que vislumbram a economia da técnica descritiva e o treinamento de forma otimizada.

2.1.5.1 Pivot Profile

A técnica *Pivot Profile* consiste na teoria comparativa entre as amostras a serem avaliadas e um padrão. Aplicável em casos estabelecidos por formulações distintas, onde se faz necessária a identificação de pontos discrepantes dentre as amostras que constituem as duplas analíticas (Thuillier, 2007; Thuillier *et al.*, 2015; Balthazar *et al.*, 2017; Deneulin *et al.*, 2018; Marcelo *et al.*, 2018).

Thuillier, (2007), observou em seu estudo sensorial que os avaliadores traziam em suas memórias informações não construtivas sobre o alimento analisado. Assim, em um painel sensorial descritivo, o parâmetro comparativo vinculado à memória

sensorial se tornara irrelevante. Para estancar este déficit as amostras passaram a ser apresentadas em pares, sendo uma a amostra incógnita e a outra, a amostra padrão para correlação, chamada de Pivot. Assim, a instrução adotada passou a ser referente aos pontos “mais” e “menos” da amostra incógnita com relação à amostra padrão (Thuillier, 2007; Thuillier *et al.*, 2015).

Esta técnica demanda um treinamento rápido, em uma sessão; imediatamente antes da realização desta técnica, esta etapa consiste da apresentação aos painelistas dos limiares máximos e mínimos referentes às principais características encontradas no produto (Valentin e Nestrud, 2016).

Para o tratamento dos dados, as respostas devem ser coletadas, lematizadas e tabuladas de forma a gerar três colunas de respostas: identificação das amostras, “mais” e “menos” (Thuillier, 2007).

Após tabulação dos dados os resultados são apresentados por um gráfico de análise de correspondência - CA, onde é possível realizar a análise dos resultados. O gráfico é projetado em duas dimensões, e sua leitura direciona as amostras aos atributos por indicação vetorial (Faria e Yotsuyanagi, 2002).

2.1.5.2 Projective Mapping

A análise sensorial por *Projective Mapping* se estrutura na teoria do agrupamento de amostras semelhantes e discrepantes sobre um espaço bidimensional sem marcações pré-definidas. Esta técnica pode ser abordada em duas fases dependendo do objetivo do ensaio, a primeira fase delinea a distinção das amostras dentro o grupo amostral por uma abordagem quantitativa e se necessário, a segunda fase abordará a dimensão qualitativa, pois solicita ao painalista descrever quais atributos julgou característico a cada grupo (Risvik *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 2011; Ares *et al.*, 2013; Vicente *et al.*, 2014; Valentin e Nestrud, 2016; Amyotte *et al.*, 2017; Varela, Antúñez, *et al.*, 2017; Varela, Berget, *et al.*, 2017; Vicente *et al.*, 2017).

Nesta técnica as amostras são avaliadas de forma holística, não sendo enfatizada a identificação de atributos separadamente. No entanto, quando um painalista avalia um produto de forma não direcionada, a tendência é a avaliação global seguida da mensuração dos atributos em destaque. Desta forma, os quimiossensores tendem a

direcionar as emoções para o ponto de foco, possibilitando a avaliação pontual de vários atributos concomitantemente, ou seja, de forma bidimensional. (Demattè *et al.*, 2011; Demattè *et al.*, 2013; Valentin e Nestrud, 2016; Varela, Antúnez, *et al.*, 2017).

Cada painelista apresenta uma abordagem e conotação cognitiva diferente para uma mesma amostra, no entanto, não existe resposta errada, todas as observações apresentadas são pertinentes às sensações daquele indivíduo e é exatamente isso que a técnica busca (Vicente *et al.*, 2017), pois, a categorização espontânea é organizada naturalmente sobre pontos estruturais de um objeto ou sobre características específicas de um produto (Valentin e Nestrud, 2016). Esta técnica é uma opção de trabalho quando as amostras apresentam representativa diferença ou quando a pesquisa se objetiva em evidenciar se as amostras incógnitas apresentam discrepância ao padrão.

O *Projective Mapping* é aplicado em análise sensorial desde 1990 por Risvik (Risvik *et al.*, 1994), mas, é amplamente difundido na área da psicologia por trabalhar com a construção psicológica da categorização. Esta é uma técnica que exige habilidades simples, podendo alcançar resultados significativos em grupos não treinados como crianças e idosos ou mesmo em grupos treinados (Valentin e Nestrud, 2016).

No entanto, as desvantagens devem ser observadas para que haja robustez e consistência nos resultados, pois o total amostral para esta técnica deve compreender um mínimo de cinco amostras (Vicente *et al.*, 2017) e as amostras devem ser apresentadas simultaneamente ao painelista, com a instrução de provar cada amostra quantas vezes julgar necessário e na ordem que desejar. Assim, esta sistemática proporciona uma possível fadiga sensorial pela quantidade analisada (Chollet *et al.*, 2011; Valentin e Nestrud, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Foram utilizadas laranjas maduras, adquiridas no mês de outubro de 2017, no comércio local do município de Belo Horizonte – MG e as nêspersas utilizadas foram coletadas no mês de janeiro de 2017, no talude da reitoria da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Os reagentes analíticos foram das marcas Merck®, Kasvi® e Alere® com as respectivas exigências analíticas. O padrão analítico de ácido ursólico foi adquirido na Sigma Aldrich® com grau de pureza estabelecido como maior ou igual a 98,5 %. Os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 35218 foram disponibilizados pelo laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extrato

Para a extração dos compostos bioativos, as nêspersas foram lavadas em água potável para retirada de sujidades grosseiras, foram secas em papel toalha e em seguida as polpas foram separadas das sementes e cada semente foi partida em dois pedaços. As porções distintas de “polpa” (mesocarpo), “polpa e semente” (mesocarpo e endocarpo) e “semente” (endocarpo), foram congeladas em um ultra freezer Ultralow da marca Nuair® a -80 °C, liofilizadas em liofilizador da Thermo Electron Corporation® ModulyoD Freeze Dryer por 24 horas e trituradas em processador de alimentos, com o intuito de aumentar a área de contato à extração. As amostras trituradas foram diluídas por solução de etanol e água em concentração 1:1 v/v. A cada vinte gramas de “polpa”, “polpa e semente” e “semente” foram utilizados 100 mL da solução. A mistura ficou sob agitação, protegida da luz e em temperatura ambiente (23 °C ± 3 °C) durante 48 horas (Delfanian, Kenari e Sahare, 2015).

Após este período, os extratos foram filtrados em papel filtro e o solvente evaporado por um rotaevaporador da marca Buchi, modelo R-215 acoplado a uma bomba Buchi Vacumm Controller, modelo V-855 à temperatura de 45 °C estabilizada em banho térmico Buchi B-491. Com o intuito de facilitar a dispersão do extrato na matriz alimentar, que é de base aquosa, a rotaevaporação foi interrompida assim que todo o etanol foi coletado no balão de destilação. Desta forma, os compostos extraídos da “polpa”, “polpa e semente” e “semente” da nêspersa ficaram diluídos apenas em água. Os extratos, foram armazenados a - 20 °C até a realização das análises (Okonogi *et al.*, 2007; Tachakittirungrod *et al.*, 2007; Pérez-Gregorio *et al.*, 2011; Delfanian, Kenari, *et al.*, 2015).

Foi selecionado, dentre os extratos da “polpa”, “polpa e semente” e “semente” da nêspersa o que apresentou a maior concentração de compostos fenólicos totais e compostos bioativos. Este extrato foi utilizado para a realização da análise de atividade antimicrobiana, a fim de obter a concentração inibitória mínima para posterior aplicação na laranja e no suco de laranja.

3.2.1.1 Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de nêspira

A metodologia padrão de quantificação de compostos fenólicos totais é a redução por reagente Folin-Ciocalteu. Foi utilizada a técnica descrita por Shahidi e Naczk, (1995), adaptada por Mcdonald *et al.*, (2001) e Delfanian, Kenari e Sahari, (2015).

Nesta análise foram utilizadas as solução de etanol 50 %, carbonato de sódio 7,5 % e o reagente Folin-Ciocalteu, que tem em sua composição os elementos químicos sulfato de lítio, tungstanato de sódio, ácido fosfórico e ácido clorídrico que são reagentes solúveis a temperatura de 20 °C, corrosivos aos metais e libera hidrogênio em reação (Shahidi e Naczk, 1995; Mcdonald *et al.*, 2001; Delfanian, Kenari e Sahare, 2015; Delfanian, Kenari e Sahari, 2015b; Merck, 2017). Para o preparo da solução padrão foi utilizado como substância de referência o ácido gálico para construir a curva de calibração com sete pontos de concentração, sendo a água Milli-Q utilizada como “Branco analítico”.

As leituras dos extratos da nêspira procederam em duplicatas usando cubetas de quartzo alocada no espectrofotômetro com seleção do comprimento de onda em 725 nm. Diante dos valores de absorbância correspondentes a cada concentração, foi possível calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação linear – R^2 , desta forma a dispersão dos pontos experimentais foram analisados e estabelecido a linearidade do método. A concentração de compostos fenólicos da “polpa”, “polpa e semente” e “semente” foram realizadas em triplicata e foi estimada usando a curva de calibração rastreada com ácido gálico em concentrações de 0,01 - 0,07 mg.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em ácido gálico por extrato ($\mu\text{g GAE.g}^{-1}$).

3.2.1.2 Determinação de compostos bioativos dos extratos de nêspira

Os compostos bioativos foram separados e identificados por análise de UPLC embasada nos parâmetros descritos por Hong-Xia *et al.*, (2014) no qual, 5 mL de cada um dos três extratos “polpa”, “polpa e semente” e “semente”, foram filtrados por um filtro de membrana de 0,22 μm antes da utilização. Para a identificação do pico de ácido ursólico foi utilizado um detector UV-vis de matriz fotodíodo em uma faixa de 200 a 400 nanômetros, uma coluna C18 com a temperatura de funcionamento em temperatura ambiente (23°C \pm 3) e fase móvel dividida em duas soluções sendo a

solução A composta por acetonitrila / água (10 : 90, v/v) e a solução B por ácido acético / acetonitrila / água (5 : 80 : 15, v/v). Em análise, o gradiente do solvente foi programado de 0 a 50 % de B em A durante cinquenta minutos a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Para limpeza da coluna foi utilizado acetonitrila.

3.2.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de nêspera

Com o intuito de identificar a concentração inibitória mínima do extrato que apresentar maior concentração de compostos fenólicos totais e de ácido ursólico, foi realizado o ensaio quantitativo desenvolvido por Kirby-Bauer adaptado por Rashed e Butnariu, (2014) onde a atividade antimicrobiana é testada por microdiluição de caldo em microplacas contra as linhagens bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 35218.

Para esta análise foi utilizado caldo Muller-Hinton - CMH conforme a Norma M7-A8 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, (2010) (Institute, 2010; Rashed e Butnariu, 2014). A padronização das bactérias foi realizada com o cultivo das linhagens em meio MacConkey, com inoculação a 37 °C, por 24 horas. Após este período uma colônia de cada microrganismo foi suspensa em CMH e para confirmação da concentração de microrganismos a turvação foi ajustada a 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1,0x10⁸ UFC.mL⁻¹) por leitura em espectrofotômetro a 620 nanômetros. Para utilização nos ensaios, as suspensões bacterianas de ambos microrganismos foram diluídas na proporção 1:1000 em CMH obtendo 1,0x10⁵ UFC.mL⁻¹ (Dalynn, 2014).

Em microplaca de 96 poços foram alocadas, em triplicata, as soluções de 50 µL de meio de cultura CMH, 50 µL do extrato selecionado com concentração variando de 1,66 até 33,33 % e posterior adição de 100 µL das suspensões bacterianas. Também foram analisados os controles de inibição de crescimento (2,5 µg.mL⁻¹ de gentamicina), os controles de viabilidade celular (somente bactérias), o controle de esterilidade (somente CMH) e os controles do extrato selecionado.

As microplacas foram incubadas em demanda bioquímica de oxigênio – BOD, com temperatura de 37 °C por um período de 24 horas. Para a determinação da concentração inibitória mínima os resultados foram verificados por

espectrofotometria em uma absorvância a 580 nanômetros usando um Leitor de Microplacas (Walasek *et al.*, 2015).

3.2.2 Aplicação do extrato no recobrimento das laranjas

Para analisar o potencial antimicrobiano dos bioativos presentes no extrato de nêspera sobre a laranja inteira, estas foram imersas em soluções com diferentes concentrações do extrato selecionado. As laranjas foram analisadas no decorrer de 30 dias por parâmetros de cor, propriedades mecânicas, perda mássica e a análise sensorial descritiva.

Dezoito laranjas foram selecionadas quanto à similaridade de coloração pelo catálogo de cores cítricas - CCI. Foram estruturados três lotes com seis laranjas e a solução de imersão foi diferenciada com relação à concentração de extrato: solução 0 % (água), solução 2,5 % (2,5 mL de extrato de semente de nêspera e 97,5 mL de água) e solução 5 % (5,0 mL de extrato de semente de nêspera e 95 mL de água). As laranjas do lote 1010 foram imersas na solução 0 % (água), do lote 1030 na solução 2,5 % (2,5 mL de extrato de semente de nêspera e 97,5 mL de água) e do lote 1060 na solução 5 % (5,0 mL de extrato de semente de nêspera e 95 mL de água). As laranjas permaneceram imersas por 2 segundos, foram escorridas e acondicionadas em caixas plástica abertas, sobre bancada em temperatura ambiente ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Cada caixa acomodou as seis laranjas de cada lote.

As análises de perda mássica e coloração foram realizadas no primeiro, décimo quinto e trigésimo dia após a imersão. A análise de propriedades mecânicas foi realizada no trigésimo dia.

3.2.2.1 Análise colorimétrica

A análise de verificação da coloração das laranjas foi realizada por colorímetro da marca Konica Minolta®, modelo CM-2500c. O equipamento foi programado para determinação no espaço CIE L^*a^*b (Takatsui, 2011). O espaço de cor $L^*a^*b^*$ ou espaço de cor CIELAB, correlaciona uniformemente a cor pela posição central ser acromática, pelo L^* ser o identificador de luminosidade e o a^* e o b^* representarem a

cromaticidade, sendo +a* a direção do vermelho, -a* a direção do verde, +b* a direção do amarelo e -b* a direção do azul (Minolta, 2017).

Os valores de L*, a* e b* foram aplicados em fórmulas para o cálculo do croma – C, do ângulo de tonalidade - h e da diferença de cor ΔE^*_{ab} , as quais estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 2 - Formulário da análise de cor

Parâmetros	Fórmulas
Croma	$C^* = (a^*)^2 + (b^*)^2$
Ângulo de tonalidade	$h = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) [graus]$
Diferença de cor	$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$
Catálogo de cores cítricas - CCI	$CCI = \frac{1000 \times a^*}{(L^* \times b^*)}$

Fonte: Cubero *et al.*, (2018); Minolta, (2017).

Sendo assim, para evidenciar a impressão de cor nos frutos cítricos, foi utilizada a fórmula do catálogo de cores cítricas – CCI, apresentadas, também na Tabela 5 (Cubero *et al.*, 2018).

3.2.2.2 Perda Mássica

Com o intuito de verificar a desidratação do fruto, foi estabelecida a análise de aferição da massa. A porcentagem de perda de massa das laranjas foi determinada conforme a equação 1.

Equação 1 - Perda mássica

$$PM (\%) = \left(\frac{P_i - P_j}{P_i} \right) \times 100$$

Em que:

PM = perda de massa (%);

Pi = peso inicial do fruto (g);

Pj = peso do fruto no período subsequente a Pi (g).

3.2.2.3 Propriedades mecânicas

A deformação das laranjas foi determinada em texturômetro de bancada, TA-XT2i Texture Analysers da Stable Micro Systems®. A elasticidade e a deformação dos frutos foram analisadas mediante as condições de 6 milímetros de distância da sonda p/4 cilíndrica de 4 mm de diâmetro, até o fruto, força aplicada de 0,98 Newton pelo tempo de 5 segundos, e este teste foi programado para percorrer uma distância de ruptura igual a 1 mm caso ocorresse ruptura da casca.

A lei de Hook e o módulo de Young possibilitaram analisar os resultados, quanto a elasticidade e a deformação das laranjas, pelas fórmulas apresentadas no formulário da Tabela 6 (Callister, 2000; Fredel *et al.*, 2010; Hibbeler, 2010).

Tabela 3 - Formulário de propriedades mecânicas

Abordagem	Fórmulas	Unidades
Módulo de Young	$E = \frac{F \times l_0}{A \times \Delta L}$	GPa
Lei de Hook	$\sigma = E \times \varepsilon$	N.m ⁻²
Tensão	$\sigma = \frac{F}{A}$	N.m ⁻²
Deformação específica	$\varepsilon = \frac{\sigma}{E}$	Adimensional

Fonte: Callister, (2000).

Em que:

F é a força (N);

A é a área do local da tensão (m^2);

ΔL variação do comprimento (m);

l_0 é a distância inicial (m);

σ é a tensão;

E é a elasticidade;

ε é a deformação específica.

Foram realizados os cálculos do módulo de Young com os resultados apresentados na unidade de Pascal – Pa, a lei de Hook com os resultados em Newton por metro quadrado – $N.m^{-2}$ e análise estatística ANOVA e teste de tukey com 5 % de significância.

3.2.2.4 Análise sensorial das laranjas

O treinamento de percepção visual das frutas foi realizado mediante imagens de laranjas em diferentes estágios de maturação, soluções coradas com corante alimentício para a verificação da cor e laranjas naturais para a constatação da textura. Como parâmetro avaliativo dos testes, a cada resposta acertiva um ponto foi atribuído ao candidato participante. Os resultados dos testes foram tabulados e somados, verificando o acumulativo individual em pontos. O somatório dos acertos deu elegibilidade aos candidatos que apresentaram aproveitamento superior a 70%.

Os termos descritores do perfil sensorial das laranjas foram levantados pelos painelistas previamente selecionados dentre os alunos e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG. Um léxico sensorial foi desenvolvido usando o método de consenso (Murray *et al.*, 2001) com base nos resultados das sessões de treinamento. Com os parâmetros sensoriais estabelecidos pelo painel no treinamento, foi possível constatar respostas sensoriais específicas e unívocas. O léxico foi estruturado aos termos descritores, com a inclusão de atributos para aparência, cor e maturação.

Os lotes de laranjas emergidos em soluções de diferentes concentrações de extrato de nêspera foram avaliados por análise descritiva quantitativa – ADQ após o período de armazenamento de 30 dias a 23 °C (± 3 °C). Foram estruturados três grupos amostrais diferenciados pela concentração de extrato na solução de imersão, que foi constituída por água Milli-Q e os respectivos volumes às proporções do extrato de nêspera. O grupo denominado 1010 teve a solução de imersão com 0 % de extrato; o grupo 1030 teve a solução de imersão com 2,5 % de extrato e o grupo 1060 teve a solução de imersão com 5 % de extrato. Cada um dos três grupos analisados foi estruturado com seis unidades de laranjas e cada laranja foi denominada por sua alocação na caixa, a Imagem 4 apresenta a alocação das laranjas, respectivas ao Lote 1060, na caixa, com suas respectivas denominações. O mesmo foi realizado para os demais lotes.

Imagem 3 - Alocação das laranjas nas caixas



Todas as laranjas de uma mesma caixa pertencem ao mesmo lote. 1060_1: 1° laranja da caixa; 1060_2: 2° laranja da caixa; 1060_3: 3° laranja da caixa; 1060_4: 4° laranja da caixa; 1060_5: 5° laranja da caixa e 1060_6: 6° laranja da caixa.

As respostas foram coletadas em uma ficha analítica não estruturada onde os painelistas foram instruídos a escrever todos os termos descritores, previamente estabelecidos por eles, que julgaram pertinentes a cada um dos frutos de cada lote.

3.2.3 Aplicação do extrato no suco de laranja

Este estudo utilizou a técnica de análise inversa sistêmica para avaliação do período útil do suco de laranja, ou seja, as amostras foram processadas em dias diferentes, de forma fidedigna, e analisadas de forma conjunta. Assim, foi possível analisar a interação do extrato com a matriz alimentar nos intervalos preestabelecidos, sem que houvesse a diferenciação das intemperes ambientais, dos erros analíticos e do funcionamento de equipamentos.

O produto desenvolvido em escala experimental foi o suco de laranja “enriquecido de compostos bioativos de nêspera”. Para este desenvolvimento, foram realizados três processos produtivos de suco com o mesmo lote de laranjas. Para minimizar as variações na fruta após a colheita, as mesmas foram acondicionadas em embalagens plásticas de polipropileno e armazenadas em câmara refrigerada até o momento da utilização.

Para o experimento, foram desenvolvidos de forma fidedigna, três processos produtivos com diferença de quinze dias entre eles, totalizando três lotes (lote A = 1° dia; lote B = 15° dia; lote C = 30° dia).

As laranjas foram espremidas em espremedor de frutas e o suco de laranja puro, foi dividido em três partes. A primeira parte foi denominada de Linha 1 e envasada sem alteração, a segunda parte denominada de Linha 2, foi constituída de suco de laranja com adição de 2,5 mL de extrato de nêspera a cada 97,5 mL de suco de laranja e a Linha 3 foi constituída de suco de laranja com adição de 5 mL de extrato de nêspera a cada 95 mL de suco de laranja. O mesmo procedimento foi repetido de forma idêntica aos lotes A, B e C.

Cada lote originou 9 garrafas de 100 mL, sendo três garrafas, respectivas a cada linha. Após o envase do suco, as garrafas hermeticamente fechadas e identificadas foram acondicionadas sob temperatura de refrigeração ($8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Foram utilizados 100 mL de suco de laranja para a realização das análises microbiológicas, químicas e físicas, e o volume remanescente permaneceu armazenado.

As análises realizadas com o suco de laranja tiveram como parâmetros para as análises microbiológicas, os preconizados pela portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997, onde no “grupo de alimentos XII - sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não alcoólicas”, o limite para Suco “*IN NATURA*” é ausência de *Salmonella* em 25 mL, para coliformes fecais número mais provável de microrganismo – NMP deve ser no máximo $10 \cdot \text{mL}^{-1}$ e para a análise de Bolores e Leveduras o máximo é de $10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$. Para os padrões de identidade e qualidade do suco de laranja a lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, foi tida como referência, pois trata do registro, da padronização, da classificação, da inspeção e da fiscalização da produção e do comércio de bebidas.

3.2.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais nos sucos de laranja

A técnica de quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada de forma similar a metodologia estabelecida para determinar os compostos fenólicos totais presentes no extrato pela técnica descrita por Shahidi e Naczki, (1995), com adaptações de McDonald *et al.*, (2001) e Delfanian, Kenari e Sahari, (2015). No entanto, por se tratar de um suco, que é uma matriz alimentar complexa, foi necessária a realização de uma etapa de extração. Esta etapa consistiu em pesar 10 mL de suco de laranja, adicionar 20 mL de etanol a 50 %, homogeneizar utilizando um agitador magnético e filtrar utilizando algodão. Em seguida, o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL. O resíduo que ficou retido no algodão foi submetido a uma nova extração. O algodão com resíduo, foi homogeneizado em agitador magnético com 20 mL de etanol 50 %, e esta solução foi filtrada como auxílio de um novo algodão, o líquido coletado desta filtração foi transferido para o balão volumétrico contendo o primeiro filtrado e o volume foi completado com etanol 50 %.

3.2.3.2 Determinação de compostos bioativos nos sucos de laranja

A análise de cromatografia líquida de ultra performance – UPLC foi realizada segundo os parâmetros descritos por Hong-Xia *et al.*, (2014) para a determinação dos compostos bioativos no suco de laranja. Dentre os compostos bioativos o ácido

ursólico será quantificado perante o perfil cromatográfico do padrão de ácido ursólico com grau de pureza maior ou igual a 98,5 %.

3.2.3.3 Sólidos solúveis

O suco foi analisado em refratômetro de bancada da marca Hanna, modelo HI 96801, segundo método AOAC n° 932.12 (AOAC, 1997; AOAC, 2007). Os resultados foram expressos em graus Brix e apresentados juntamente aos resultados do Ratio (Brasil, 2000).

3.2.3.4 Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada pelo método da Acidez Titulável de Produtos de Frutas, segundo método n° 942.15 – AOAC, (1997), e calculada a partir do volume necessário de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ para titular dez gramas de amostra homogeneizada em 90 mL de água Milli-Q e o ponto de hidrogenação corrigido ao pH de 8,1. O resultado foi expresso em termos de gramas de ácido cítrico anidro por 100 gramas de suco e apresentados juntamente aos resultados do Ratio (AOAC, 1997).

3.2.3.5 Ratio

A relação entre o teor de sólidos solúveis e a acidez titulável da bebida é denominada por ratio. A fórmula para o cálculo está apresentada na Tabela 7.

Tabela 4 - Fórmula para o cálculo do Ratio

$$Ratio = \frac{^{\circ}Brix}{Acidez}$$

Fonte: Almeida (2013).

Nesta análise deve ser observada a origem dos frutos, pois os padrões estabelecidos à uma determinada região produtiva, não necessariamente, é adequada a outra (Almeida, 2013).

3.2.3.6 Açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método n° 923.09, 920.183b – AOAC, e os valores apresentados porcentagem (%) de açúcares totais no suco (Nielsen, 2009).

3.2.3.7 Atividade de água

Esta análise foi realizada em equipamento da marca AQUALAB, modelo 3TE e serie 02058962/B, conforme IT 19.11-04 analisador atividade de água (UFMG, 2018).

3.2.3.8 Determinação do potencial hidrogeniônico

O potencial hidrogeniônico foi determinado, segundo método n° 981.12, por aferição direta em pHmetro de bancada, o equipamento utilizado é da marca Bante, modelo 920 (AOAC, 1997).

3.2.3.9 Avaliação microbiológica dos sucos de laranja

A Resolução da diretoria colegiada - RDC da Agência Nacional da Vigilância Sanitária - ANVISA na data de 12 de janeiro de 2001, resolve os parâmetros microbiológicos que o suco de laranja natural, adicionados ou não de conservadores deve seguir, onde é tolerável a ausência de coliformes a 35 °C em 50 mL de amostras indicativas em sucos (Brasil, 2001).

De acordo com o item dois do anexo um da RDC n° 12, deve ser observada a possibilidade de enquadramento do suco elaborado em outro item do grupo dezessete que trata não só da abordagem de sucos com ou sem adição de conservantes, mas de “sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não alcoólicas, excluindo os de base láctea e de chocolate (cacau e similares)”. Visando englobar todas as abordagens microbiológicas para este grupo de alimentos, foram realizadas, adicionalmente, análises de *Salmonella spp.* e coliformes a 45 °C em 50 mL (Brasil, 2001). Segundo Silva e Fonseca (1999), a análise de bolores e leveduras em sucos de laranja também deve ser realizada para o controle do período útil do suco de laranja (Silva e Fonseca, 1999).

3.2.3.9.1 Coliformes totais e termotolerantes

Para a realização da análise de coliformes termotolerantes, o protocolo utilizado foi estabelecido de acordo com o “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*” da “*American Public Health Association*” (Kornacki *et al.*, 2013). Esta metodologia é denominada de Método de tubos múltiplos que apresenta os resultados por NMP.

Nesta metodologia, foi pesada de forma asséptica 25 gramas, de cada amostra, em frascos estéreis, contendo 225 mL de água peptonada tamponada e estes frascos foram homogeneizados por um minuto.

Para o teste presuntivo, 1 mL da solução homogeneizada foi dispensado em tubos de ensaio com tubos de Durham invertidos e 9 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose - LST, esta etapa foi realizada em pentaplicata nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} de cada amostra. Os tubos foram incubados a temperatura de 35 °C ($\pm 0,5$ °C) por um período de 48 horas. Após este período, foram selecionados os tubos com formação de gás no interior do tubo de Durham, o que os classifica como positivos para o teste presuntivo, e estes tubos, por sua vez, foram direcionados aos testes confirmativos de coliformes totais e termotolerantes.

Para o teste confirmativo de coliformes totais, foi transferida uma alçada de cada tubo positivo no teste presuntivo para um tubo de ensaio contendo Caldo Verde Brilhante Bile – VB e tubos de Durham invertidos. Os tubos de ensaio foram incubados a temperatura de 35 °C ($\pm 0,5$ °C) por um período de 48 horas com posterior avaliação de formação de gás no interior dos tubos de Durham (Medeiros *et al.*, 2012).

Para o teste de coliformes termotolerantes, foi transferida uma alçada de cada tubo positivo no teste presuntivo para um tubo de ensaio contendo caldo EC e tubos de Durham invertidos. Os tubos de ensaio foram incubados em banho térmico a uma temperatura de 44,5 °C ($\pm 0,2$ °C) por um período de 48 horas com posterior avaliação de formação de gás no interior dos tubos de Durham.

3.2.3.9.2 *Salmonella spp.*

Para a realização da análise de *Salmonella spp.*, o protocolo utilizado foi estabelecido de acordo com o capítulo 9 do “*Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*” da “*American Public Health Association*” (Kornacki *et al.*, 2013)

Foi pesado de forma asséptica, 25 gramas de amostra em frasco estéril, adicionado 225 mL de caldo lactosado e homogeneizado. Após homogeneização, o frasco foi acondicionado em câmara climatizada a 35 °C (± 2 °C) por um período de 24 horas (± 2 h). Após as 24 horas, alíquotas de 1 mL da amostra na solução pré-enriquecida, foram transferidas para tubos contendo 10 mL de Caldo Tetracionato – TT e Rappaport Vassiliadis Soy - RSV, separadamente, e novamente, acondicionado em câmara climatizada a 37 °C (± 2 °C), por um período de 24 horas (± 2 h). Transcorrido este intervalo de tempo, todos os tubos foram agitados em agitador até a formação de um vortex e após homogeneização, foram coletadas, de forma estéril, três alçadas de cada tubo e as mesmas foram estriadas, uma por vez, respectivamente às placa de petri contendo o meio Ágar Entérico de Hecktoen – HE, o meio *Salmonella-Shigella* – SS e o meio Ágar Xilose Lisina Desoxicolato – XLD. Estas placas foram incubadas a 35 °C (± 2 °C), por um período de 24 horas (± 2 h) e posteriormente analisadas quanto à formação de colônias típicas de *Salmonella spp.* A identificação de colônias típicas de *Salmonella spp.* nos meios seletivos foi realizada de forma macroscópica, valendo da formação de pontos negros na região central da colônia.

Para a identificação presuntiva, uma colônia típica será coletada e estriada no bisel dos meios de triagem Ágar Lisina Ferro - LIA, visando à identificação presuntiva das enterobactérias e o Agar ferro triplo açúcar - TSI, para a diferenciação de bastonetes Gram negativos.

3.2.3.9.3 *Contagem total de bolores e leveduras*

A contagem total de bolores e leveduras em suco de laranja foi realizada pela técnica de “pour plate” em Agar Batata Dextrose - ABD. Este Agar demanda ajuste do ponto de hidrogenação a 3,5 de pH, este ajuste é realizado com a adição de 1,5

mL de solução de ácido tartárico a uma concentração de 10 % para cada 100 mL de meio. Esta correção de pH propicia a multiplicação de bolores e leveduras no meio reacional (Almeida, 2013).

Para a realização deste protocolo foi aferido de forma asséptica, 25 mL de amostra, posteriormente adicionado 225 mL de água peptonada tamponada e homogeneizado. As diluições de 10^{-2} e 10^{-4} foram realizadas e 1 mL de cada diluição foi colocado em duplicata nas placas de petri estéreis. Posteriormente, foi adicionado em cada placa aproximadamente 15 mL do ABD previamente fundido e estabilizado em banho térmico a $45\text{ °C} (\pm 1,0\text{ °C})$. As placas foram homogeneizadas cuidadosamente em movimentos similares ao formato do número oito. Após homogeneização, as placas foram mantidas estáticas até a completa solidificação para posterior incubação de forma invertida em câmara climatizada a $25\text{ °C} (\pm 1,0\text{ °C})$ pelo período de 96 horas. Após este período, a leitura das placas procede em leitor de colônia com lupa, devendo ser considerada como uma unidade formadora de colônia, toda colônia com características típicas à levedura. A fórmula para verificação das unidades formadoras de colônia por cada mililitro é apresentada na Tabela 8.

Tabela 5 - Fórmula das unidades formadoras de colônia por mililitro

$$\frac{UFC}{mL} = n \times fd$$

Fonte: Almeida, (2013)

Em que:

N = número de colônias contadas;

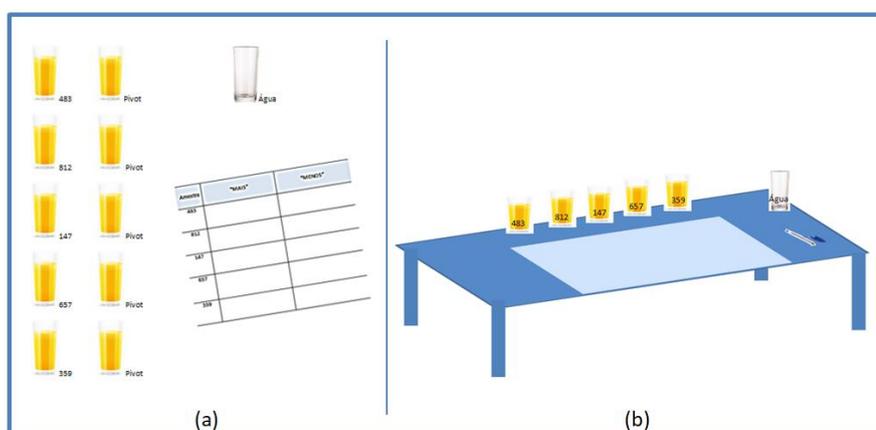
fd = fator de diluição;

3.2.3.10 Análise sensorial dos sucos de laranja

O suco de laranja foi analisado sensorialmente pelas técnicas de *Pivot Profile* que analisa as amostras de forma comparativa ao padrão e o esquema de apresentação

das amostras é tido pela exposição das duplas analíticas, ficha avaliativa, caneta e água, conforme Imagem 5 (a) e *Projective Mapping* que direciona o painelista ao agrupamento das amostras, apresenta em seu layout analítico a exposição das amostras de forma conjunta e ficha analítica compreendida por uma folha branca com dimensões de 50 x 70 cm, caneta e água, conforme Imagem 5 (b).

Imagem 4 - Apresentação de amostras, *Pivot Profile* (a) e *Projective Mapping* (b)



O treinamento sensorial, para as duas técnicas, foi realizado de forma rápida em uma sessão de 30 minutos antes da avaliação sensorial, esta etapa apresentou aos painelistas em grupo, os limiares máximos e mínimos dos atributos da laranja, do suco de laranja e do extrato de nêspera.

Para a coleta dos dados na técnica *projective mapping*, foi elaborado um gabarito, em transparência, com a mesma dimensão da folha analítica com estampa quadriculada de 5 cm². Após realização da técnica pelo painelista, o local foi fotografado e a sequência numérica anotada; no local respectivo a cada amostra foi alocado um marcador e o gabarito posicionado sobre a folha analítica, desta forma foi verificada a leitura dos eixos x e y representativos de cada amostra. Na análise estatística os dados foram tratados de forma que os resultados de cada julgador compreendessem duas colunas da tabela de respostas, sendo estas colunas os valores das coordenadas cartesianas de cada marcador.

Para coleta dos dados da técnica *Pivot Profile*, as respostas tabuladas foram verificadas e o número de ocorrência de cada termo descritor foi somado nas colunas “mais” e “menos”, respectivamente a cada amostra incógnita. A quantidade de vezes que o termo descritor apareceu na coluna “menos” foi subtraída do somatório de ocorrências deste mesmo termo na coluna “mais”. Em sequência foi estabelecida a Frequência Traduzida que tornou os valores positivos, para assim, ser aplicada a análise estatística de correspondência – CA.

Foram elaboradas três formulações adicionadas com diferentes concentrações do extrato de nêspera selecionado e duas formulações sem adição deste extrato. As amostras de suco de laranja adicionadas com este extrato foram numeradas por 147, 657 e 812, contendo respectivamente 1 %, 2,5 % e 5 % de extrato. As amostras numeradas pelos dígitos 483 e 359 foram elaboradas com suco de laranja puro.

As avaliações sensoriais dos sucos de laranja foram aplicadas logo após o treinamento. Como as técnicas *Pivot Profile* e *Projective Mapping* são distintas e não habituais ao painel, elas foram apresentadas e as dúvidas foram sanadas de forma conjunta aos painelistas, no final do treinamento.

3.2.4 Análise estatística

As médias e respectivas significâncias foram avaliadas por Análises de Variância - ANOVA e Teste de médias de Tukey a um nível de 5 % ($p < 0,05$) de significância. Os resultados foram expressos em média seguidos do desvio padrão. Os cálculos foram realizados por programas estatísticos computacional Minitab® (2018) e Excel® (2010).

Para a análise sensorial das laranjas a estatística utilizada foi a Análise de Componentes Principais para estabelecer uma matriz de correlação entre os termos descritores levantados pelos painelistas, que corresponde ao coeficiente de correlação entre as amostras, onde as matrizes de covariância alocam mais peso aos termos com maior ocorrência (Silva *et al.*, 2010; Leonardo *et al.*, 2016). Os cálculos foram realizados pelo programa estatístico computacional Excel®, (2010).

Para a análise sensorial dos sucos de laranja os resultados da técnica *Pivot Profile* foram analisados pelo programa estatístico computacional Excel®, (2010) com o

suplemento XLSTAT, (2014), por Análise de correspondência - CA para estabelecer uma matriz de correspondência entre os termos descritores levantados pelos painelistas.

Para a análise dos resultados da técnica *Projective Mapping* foi utilizado o programa estatístico computacional Excel®, (2010) com o suplemento XLSTAT, (2014) por Análise de Componente Principal – ACP e por Análise Fatorial múltipla (AFM) com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRATO

Foram coletados 100 mL de cada um dos extratos , da “polpa”, da “polpa e semente” e da “semente” da nêspera e estes extratos permaneceram armazenados a - 20 °C até a realização das análises. O extrato da polpa apresentou diferença aos outros dois extratos quanto a rota evaporação, pois, esta foi a amostra que demandou maior tempo para rota evaporar o etanol presente na solução extratora. De forma similar, nos três extratos, a rota evaporação foi cessada assim que todo etanol foi evaporado.

Assim, foi possível avaliar os três extratos e selecionar um deles, levando em consideração a concentração de compostos fenólicos totais e compostos bioativos. Também foi estabelecido, de acordo com as concentrações inibitórias mínimas contra os microrganismos estudados na análise de MIC, as concentrações aplicadas na laranja e no suco de laranja.

4.1.1 Compostos fenólicos dos extratos por Folin-Ciocalteu

Para a apresentação do resultado do teor de fenólicos totais as concentrações de ácido gálico foram correlacionadas às leituras de absorbâncias e foi verificado que a equação da reta $y=0,0641x+0,0088$ apresentou o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9999$. Com estes valores foi possível estimar a concentração de fenólicos totais presentes nos extratos. Estão apresentados na Tabela 9 os valores calculados em média das triplicatas, seguido do desvio padrão.

Tabela 6 - Concentração de fenólicos totais nos extratos

Amostras	$\mu\text{g GAE.g}^{-1}$
Extrato “polpa”	$3,68 \pm 03,88^b$
Extrato da “semente”	$234,64 \pm 45,32^a$
Extrato da “polpa e semente”	$230,98 \pm 12,55^a$

Médias com respectivo desvio padrão estão seguidos de letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); n amostral igual a 3.

Por esta técnica, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os extratos da “semente” e da “polpa e semente” os quais apresentaram as maiores concentrações de fenólicos totais. Tanto a amostra do extrato de “semente” quanto a de “polpa e semente” apresentaram resultados similares aos encontrados na literatura para o extrato de nêspera (Delfanian, Kenari e Sahare, 2015).

O valor de fenólicos totais do extrato da polpa ficou abaixo dos valores já encontrados em literatura, no entanto, Delfanian, Kenari e Sahare, (2015) realizaram a comparação entre as técnicas de extração por solução de etanol-agua (1:1 v/v), com e sem ultrassom. Verificaram que os valores do extrato com a etapa de ultrassom foram menores, nesta comparação, evidenciaram que interferentes à técnica de extração hidro-etanólico podem degradar possíveis fenólicos (Delfanian, Kenari e Sahare, 2015).

O extrato da polpa de nêspera apresentou valor médio de fenólicos totais igual a $3,6817 \pm 3,88 \mu\text{g GAE.g}^{-1}$ esta amostra foi exposta por um tempo maior à rota evaporação, quando comparado ao tempo necessários de rota evaporação do etanol nos extratos da “polpa e semente” e “semente”. No entanto, o tempo de rota evaporação para os três extratos foi o tempo necessário para a evaporação total do etanol. O tempo de exposição a temperatura de rota evaporação pode ter degradado os compostos fenólicos Este pode ser o motivo pelo qual o resultado de compostos fenólicos totais do extrato da polpa foi significativamente menor que os demais, pois,.

Chen *et al.*, (2017) avaliaram em um grama do pó das folhas de 14 espécies vegetais e os compostos fenólicos variaram, dentre as espécies de $5,11 \pm 0,01$ a $55,46 \pm 0,21 \text{ mg GAE g}^{-1}$, ou seja, as variedades de nêspera existentes podem apresentar diferença com relação aos compostos fenólicos totais, podendo ser este fruto, classificado por ter menores valores de fenólicos totais em polpa.

Apesar de estes resultados serem lidos em um comprimento de onda correspondente ao pico de absorção dos óxidos de molibdênio e tungstênio, esta metodologia de determinação de compostos fenólicos totais pelo reagente de *Folin-Ciocalteu* também apresenta redução aos compostos não fenólicos, o que pode fornecer à técnica baixa especificidade (Granato e Nunes, 2016).

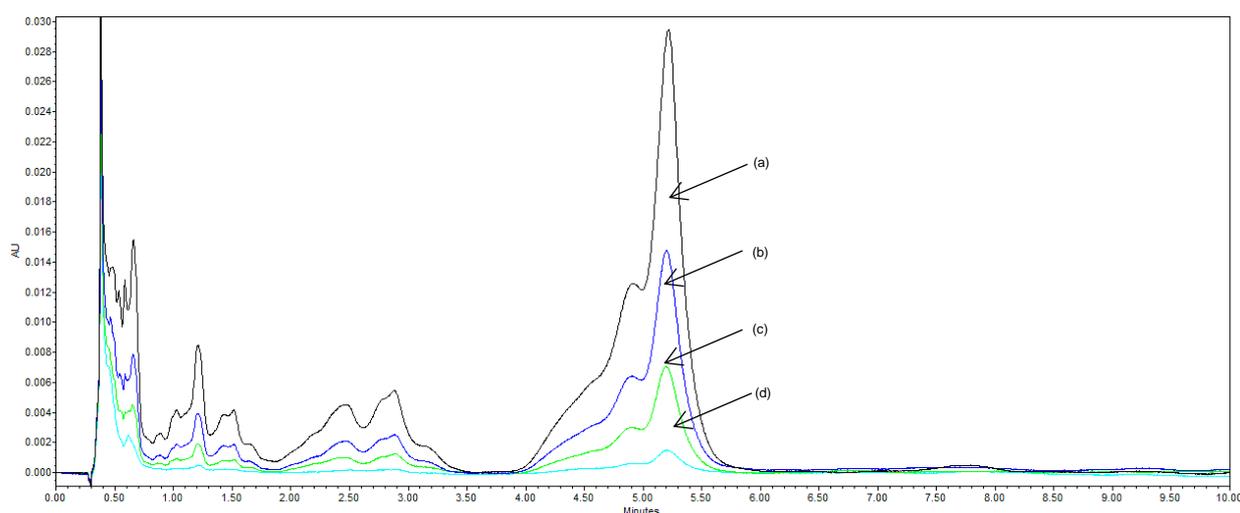
4.1.2 Compostos bioativos dos extratos por UPLC

Para determinação da concentração de ácido ursólico no extrato foi realizada a análise por cromatografia líquida de ultra performance - UPLC.

O padrão de ácido ursólico foi injetado nas condições pré-estabelecidas e a partir dos respectivos valores de absorbância das concentrações, que variaram de 10–150 ppm, calculou-se a equação da reta ($Y = 8209,4x$) e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9957$).

O Gráfico 1 apresenta o perfil das soluções do padrão de ácido ursólico nas concentrações de 100, 50, 25 e 10 ppm.

Gráfico 1 - Perfil cromatográfico do ácido ursólico



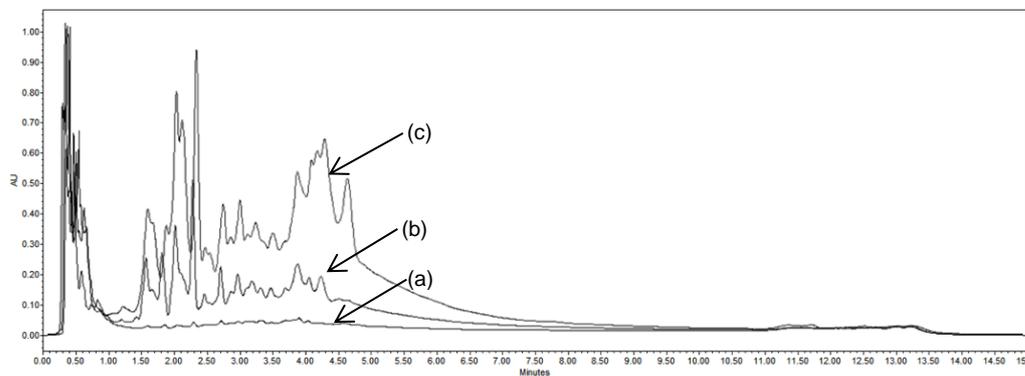
Perfil cromatográfico do padrão de ácido ursólico, em destaque os isômeros ácido oleanólico e ursólico compreendido no intervalo de tempo de retenção de 4 a 6 minutos; concentração de ácido ursólico (a) 100 ppm; (b) 50 ppm; (c) 25 ppm e (d) 10 ppm.

No intervalo do tempo de retenção compreendido entre quatro e seis minutos é possível verificar o comportamento das curvas de ácido ursólico. O perfil cromatográfico é característico aos ácidos isômeros deste estudo, sendo referenciado em literatura, como a primeira oscilação da curva, respectivo ao ácido oleanólico e o pico da curva típico ao ácido ursólico (Wu *et al.*, 2013).

Os extratos foram injetados nas mesmas condições do padrão. Os extratos da “polpa” e da “polpa e semente” da nêspera tiveram resultados de concentração de

ácido ursólico inferiores ao extrato da “semente”. O Gráfico 2 apresenta as amostras referentes aos extratos da “polpa”, “polpa e semente” e “semente”.

Gráfico 2 - Perfil cromatográfico dos extratos



(a) “Polpa”; (b) “Polpa e semente”; (c) “Semente”.

No perfil cromatográfico da polpa foi possível verificar a baixa ocorrência de compostos orgânicos, já que a 210 nanômetros com a fase móvel composta por acetonitrila e água, os intervalos iniciais de retenção abrangem os compostos mais polares, que são os compostos bioativos e ao final da corrida lê-se a detecção dos compostos apolares. Quando comparado, os perfis do extrato da “polpa”, da “polpa e semente” e da “semente” é possível visualizar que o extrato da polpa apresenta concentração irrisória de bioativos e o extrato da semente apresenta o perfil mais expressivo com relação a presença destes compostos. Para a extração, foram utilizados frutos maduros de nêspera, no entanto, há um maior acumulo de bioativos na polpa de frutos imaturos (Peixoto *et al.*, 2012).

O extrato que apresentou maior quantidade de compostos orgânicos foi o da semente da nêspera, por esse motivo, este extrato foi selecionado para a realização da análise que identifica a concentração mínima necessária para a inibição de um microrganismo.

4.1.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de nêspera

A atividade antimicrobiana dos extratos da semente de nêspera foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Após realização do protocolo foi verificado que

nos poços com o controle de viabilidade celular, contendo o meio MH e os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*, evidenciou-se turbidez no meio, o que demonstra a multiplicação dos microrganismos (Luber *et al.*, 2003; Institute, 2010; Rashed e Butnariu, 2014). Da mesma forma, poços contendo gentamicina e os microrganismos, referentes ao controle de inibição, e os poços contendo apenas meio MH, para o controle de esterilidade, demonstraram ausência de turbidez após o período de incubação (Institute, 2010).

Os poços contendo o meio MH e os extratos com 100 e 80 % de concentração apresentaram turbidez, de coloração alaranjada e névoa sobrenadante, sendo esta a característica de um meio MH com extrato de nêspira após 24 horas (Rashed e Butnariu, 2014).

Os poços contendo as concentrações dos extratos, variando de 33,33% a 1,66%, avaliados em *E. coli* e *S. aureus*, apresentaram ausência de turbidez, além de um aglomerado denso no fundo do poço, com exceção da triplicata respectiva a concentração de 1,66 % de extrato e *E. coli*, na qual o aglomerado estava suspenso. Esta conformação demonstra que os microrganismos não se multiplicaram e, suas células, juntamente aos compostos presentes no extrato, possivelmente aglomeraram-se de forma abrupta.

O extrato da semente de nêspira apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e Gram-negativas, *Escherichia coli* ATCC 35218. Para *S. aureus* a inibição ocorreu com 1,66 % de extrato, correspondendo a $0,29 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ de ácido ursólico e frente *E. coli* com 3,33 % de extrato, o que corresponde a $0,58 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ácido ursólico.

Rashed e Butnariu, (2014) evidenciaram ação antimicrobiana em $0,250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ácido ursólico em extrato metanólico do caule da nêspira frente aos *S. aureus* e $0,125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ frente a *E. coli* (Rashed e Butnariu, 2014).

Dados da literatura demonstraram que há diferenças na concentração da inibição de linhagens bacterianas de uma mesma espécie pela ação do ácido ursólico isolado. Para a inibição de linhagens de *S. aureus*, as concentrações variaram de $\geq 0,033 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ até $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e para linhagens de *E. coli*, $0,010$ a $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Kashyap *et al.*, 2016).

Desta forma, os valores de ácido ursólico encontrados no extrato hidro-etanólico da semente da nêspera foram condizentes com a literatura e as concentrações eficazes à inativação de *S. aureus* foram similares às já encontradas, no caso de *E. coli*, os valores foram superiores à concentração necessária do extrato metanólico e condizente ao ácido ursólico isolado. A concentração necessária de ácido ursólico presente no meio para a inibição de *E. coli* foi superior a necessária para a inibição de *S. aureus*, este microrganismo é um Gram-negativo geralmente resistência antimicrobiana. A evidência da atividade antimicrobiana do ácido ursólico presente no extrato da nêspera contra os microrganismos estudados, *S. aureus* e *E. coli*, faz deste extrato, uma alternativa ao controle microbiológico em alimentos, tendo em vista a evolução da resistência destes microrganismos a substâncias químicas tradicionalmente utilizadas para inibi-los e a necessidade por novos agentes antimicrobianos (Walasek *et al.*, 2015).

O extrato da semente de nêspera apresentou $234,65 \pm 45,32 \mu\text{g GAE.g}^{-1}$ de fenólicos totais, $1,77 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ácido ursólico e houve inibição de *E. coli* e *S. aureus* com as concentrações de 3,33 % e 1,66 % de extrato, respectivamente. Assim, o extrato da semente da nêspera foi escolhido para a realização do estudo antimicrobiano no recobrimento das laranjas e na formulação do suco de laranja. Esta escolha coincide com os estudos de Koba *et al.*, (2007) onde evidenciaram que a bioatividade do extrato etanólico de semente de nêspera demonstra maior ação protetora ao LDL, quando comparado aos extratos etanólico do exocarpo ao do mesocarpo da nêspera.

4.2 ANÁLISES DAS LARANJAS

4.2.1 Análise Colorimétrica

Para avaliar fatores de senescência natural à pós-colheita, foi realizada a análise de cor nas laranjas. A Tabela 10 apresenta os resultados calculados de ângulo hue - h*, croma C* e CCI com os valores de L*, a* e b* obtidos em colorímetro, e calculados pelas fórmulas anteriormente apresentadas, em média das triplicatas, seguido do desvio padrão.

Tabela 7 - Parâmetros de cor das laranjas

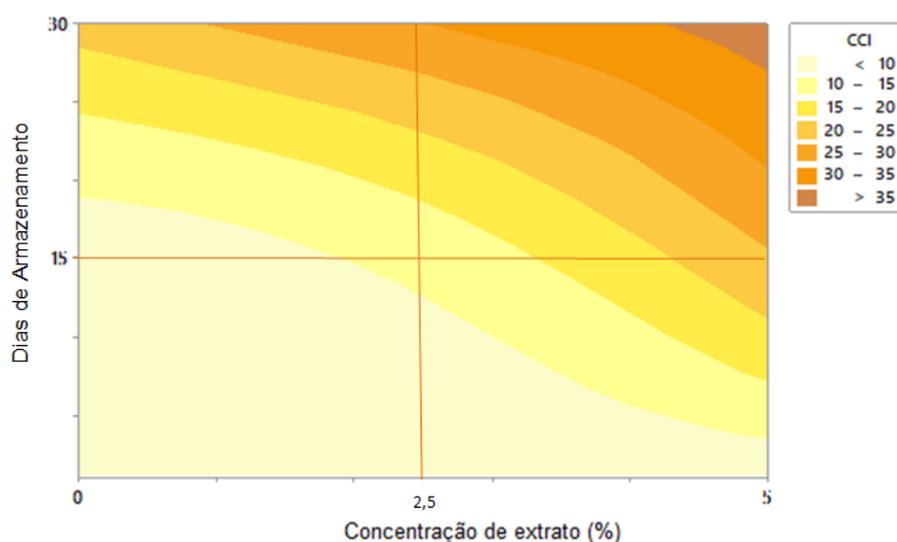
	Ângulo hue - h*		
	Lote 1010	Lote 1030	Lote 1060
	h*		
0 dias	62,04 ± 26,92 ^{aA}	62,04 ± 26,92 ^{aA}	62,04 ± 62,04 ^{aA}
15 dias	57,29 ± 27,70 ^{aA}	48,69 ± 48,69 ^{aA}	37,13 ± 19,94 ^{aA}
30 dias	42,35 ± 14,18 ^{aA}	38,83 ± 38,83 ^{aA}	36,27 ± 36,27 ^{aA}
	Croma - C*		
	Lote 1010	Lote 1030	Lote 1060
	C*		
0 dias	53,62 ± 23,07 ^{aA}	53,62 ± 23,07 ^{aA}	53,62 ± 23,07 ^{aA}
15 dias	48,95 ± 23,11 ^{aA}	40,79 ± 21,36 ^{aA}	33,02 ± 18,27 ^{aA}
30 dias	38,34 ± 13,89 ^{aA}	35,74 ± 14,00 ^{aA}	34,29 ± 13,78 ^{aA}
	Catálogo de cores cítricas - CCI		
	Lote 1010	Lote 1030	Lote 1060
	CCI		
0 dias	6,49 ± 2,40 ^{aA}	6,49 ± 2,40 ^{aA}	6,49 ± 2,40 ^{aA}
15 dias	7,52 ± 1,62 ^{aA}	11,79 ± 2,03 ^{aB}	24,32 ± 1,60 ^{bC}
30 dias	22,13 ± 1,70 ^{bA}	29,99 ± 0,27 ^{bB}	37,07 ± 0,81 ^{bC}

Os lotes são diferenciados pela concentração de extrato de semente de nêspera na solução de imersão, sendo o lote 1010, 0 %; lote 1030, 2,5 %; lote 1060, 5 %. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas diferem na mesma linha, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); n amostral de cada lote é igual a 6.

As posições dos valores estão alocadas dentre as cores laranja e amarelo, esta faixa compreende de zero à noventa graus. Assim, os parâmetros colorimétricos avaliados não evidenciaram diferença estatística ($p > 0,05$) na adição de extrato de nêspera, nas concentrações de 2,5 e 5 %.

O cálculo da cor por CCI evidenciou distinção entre algumas amostras. É possível verificar no Gráfico 4 que os frutos que receberam tratamento por imersão com as soluções de extrato de nêspera nas concentrações de 2,5 e 5,0 % apresentaram no décimo quinto dia, maior valor de CCI do que o lote 1010 sem adição do extrato ($p > 0,05$), constatando a antecipação da alteração de cor. Foi possível observar que no trigésimo dia as amostras dos lotes 1010, 1030 e 1060 apresentam diferença estatística ($p > 0,05$) e desta forma, pode-se inferir que o extrato interferiu na conservação dos frutos no período de 30 dias.

Gráfico 3 – Gradiente pelo catálogo de cores cítricas nos lotes



Os resultados apresentados no Gráfico 4 compreenderam os valores positivos do catálogo, onde o ponto zero para CCI corresponde a cor verde-amarelada que é a classificação que designa frutos de maturação intermediária indo até a coloração laranja avermelhada, que designa frutos maduros (Singh *et al.*, 2017).

Os compostos bioativos antioxidantes, quelantes ou complexantes, podem retardar a alteração de cor de vegetais, no entanto, os resultados dos bioativos da nêspera em laranjas inteiras avaliados por CCI não apresentaram esta resposta. No estudo que avaliou a descoloração por autooxidação de 12 gramas de ácido linoleico com a adição de extrato hídrico e etanólico de ácido ursólico e β -caroteno, a solução com β -caroteno foi completamente descoradas e ambas as soluções com ácido ursólico retardaram a descoloração do ácido linoleico (Koba *et al.*, 2007; Amaral, 2014).

Diante disto, possivelmente a diluição do extrato de semente de nêspira nas concentrações de 2,5 e 5 % em água provocou a inatividade dos compostos bioativos que atuam na prevenção da descoloração.

4.2.2 Perda mássica

A evolução da massa dos frutos foi calculada em porcentagem de perda mássica ($p > 0,05$), sendo a média dos valores analisada estatisticamente. Na Tabela 11 estão apresentadas as médias das triplicatas, em porcentagem, seguido do desvio padrão. É possível verificar na Tabela 11 que não houve diferença significativa de perda mássica entre os lotes, ao longo dos 30 dias de armazenamento.

Tabela 8 - Média da perda mássica nos lotes de laranja

Lote	Média da perda mássica por período		
	1º quinzena	2º quinzena	30 dias
	Medias das %		
1010	9,22 ± 0,73 ^{aA}	9,19 ± 1,68 ^{aA}	17,57 ± 2,14 ^A
1020	9,22 ± 2,07 ^{aA}	8,85 ± 2,45 ^{aA}	17,28 ± 4,07 ^A
1030	9,96 ± 3,30 ^{aA}	7,73 ± 1,02 ^{aA}	15,62 ± 2,04 ^A

Os lotes são diferenciados pela concentração de extrato de semente de nêspira na solução de imersão, sendo o lote 1010, 0 %; lote 1030, 2,5 % e lote 1060, 5 %. Médias com os respectivos desvios padrão estão seguidos de letras minúsculas diferindo na linha e maiúscula diferindo na coluna, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); n amostral de cada lote é igual a 6.

Nas aferições quinzenais, houve variação da porcentagem de perda mássica das laranjas, sendo a perda de massa da primeira quinzena do lote 1010 o valor de 9,22 ± 0,73 e a perda mássica da segunda quinzena igual a 9,19 ± 1,68 %. Esses valores atribuídos ao lote 1010 correspondem ao limiar padrão desta análise, pois a solução de imersão é igual a 0 % de extrato, estando as laranjas ao natural. No entanto, por análise de perda mássica não há evidência da influência do extrato na superfície externa das laranjas, demonstrando que a maturação prosseguiu de forma similar em todos os frutos.

4.2.3 Propriedades mecânicas

A Tabela 12 apresenta os resultados dos Lotes 1010 com 0 % de extrato, 1030 com 2,5 % de extrato e 1060 com 5 % de extrato à análise de elasticidade e de deformação. Valores calculados em média das hexaplicatas, seguido do desvio padrão.

Tabela 9 - Propriedades mecânicas das laranjas

Lote	Elasticidade	Deformação
	Pa	N.m ⁻²
1010	6035,25 ± 554,63 ^a	0,10 ± 0,00 ^a
1020	7010,68 ± 784,91 ^a	0,10 ± 0,01 ^a
1030	6970,22 ± 1396,83 ^a	0,09 ± 0,01 ^a

Os lotes são diferenciados pela concentração de extrato de semente de nêspera na solução de imersão, sendo o lote 1010, 0 %; lote 1030, 2,5 % e lote 1060, 5 %. Médias com os respectivos desvio padrão estão seguidos de letras minúsculas diferindo na coluna, pelo teste de Tukey, com 5% de significância, n amostral de cada lote é igual a 6.

Segundo Amaral, (2014) a textura de um alimento é estruturada em parâmetros mecânicos como a deformação, que resulta das características das ligações internas do alimento e a elasticidade que demonstra a velocidade que o alimento se recupera da força aplicada à deformação. Desta forma, as ligações intrínsecas das laranjas dos três lotes apresentaram resistência similar ao aplicar uma força elástica, não diferindo estatisticamente.

Na realização desta análise a força de 0,98 Newtons foi adequada para que a sonda percorresse a distância elástica na laranja inteira. No entanto, ao analisar mecanicamente uma laranja inteira fresca, deve ser levado em consideração que este é um alimento de sistema multi-complexo, onde coexiste uma casca firme, mesocarpo externo com numerosas vesículas de óleo e mesocarpo interno esponjoso branco (albedo), subdividido de 10 a 16 segmentos ou carpa, fragilmente unidos, uma crosta separável, vesículas de suco em forma de alvéolos e sementes (Pallottino *et al.*, 2011).

Paralelamente a propriedade mecânica de deformação não diferiu estatisticamente dentre os lotes, pois a recuperação da força exercida sobre a superfície das laranjas apresentou simetria nos resultados.

Assim, para as propriedades mecânicas de deformação e elasticidade não houve evidências de diferença significativa entre os tratamentos, sendo rejeitado o teste f com significância de 5 %.

4.2.4 Análise sensorial

4.2.4.1 Painelistas

As análises de avaliação sensorial das laranjas e dos sucos de laranja, foram realizadas pelos mesmos painelistas, estes foram selecionados mediante aplicação de questionário de autopreenchimento, disponibilizado no GoogleDocs, previamente autorizado pelo COEP CAAE 78955317.4.0000.5149. De acordo com as respostas, 12 pessoas, dentre alunos e funcionários, apresentaram perfil e interesse em participar das análises sensoriais de suco de laranja com adição de conservante orgânico. Dois terços dos participantes foram mulheres, cinquenta por cento com idade entre 18 e 25 anos e ensino superior incompleto, com renda familiar na faixa de 6 a 10 salários mínimos. Os participantes não estavam em dieta especial, não apresentavam restrição ao consumo de laranja ou produtos de laranja. Todos afirmaram gostar de laranja e ter o hábito de consumo da fruta frequente e/ou esporádico, já o consumo de produtos contendo laranja é frequente para 66,7 % dos participantes.

4.2.4.2 Treinamento

Todos os voluntários tiveram pontuação maior ou igual a 70 % nos testes preliminares, sendo então selecionados para dar continuidade as avaliações sensoriais.

O treinamento foi realizado durante seis meses, em sessões semanais. Neste período foi apresentado aos painelistas a laranja ao natural e fotos de laranjas sadias e senescentes. Os limiares máximos e mínimos atribuídos às laranjas ao natural e às fotos estabeleceram o léxico causal a estes painelistas.

4.2.4.3 Análise descritiva quantitativa das laranjas

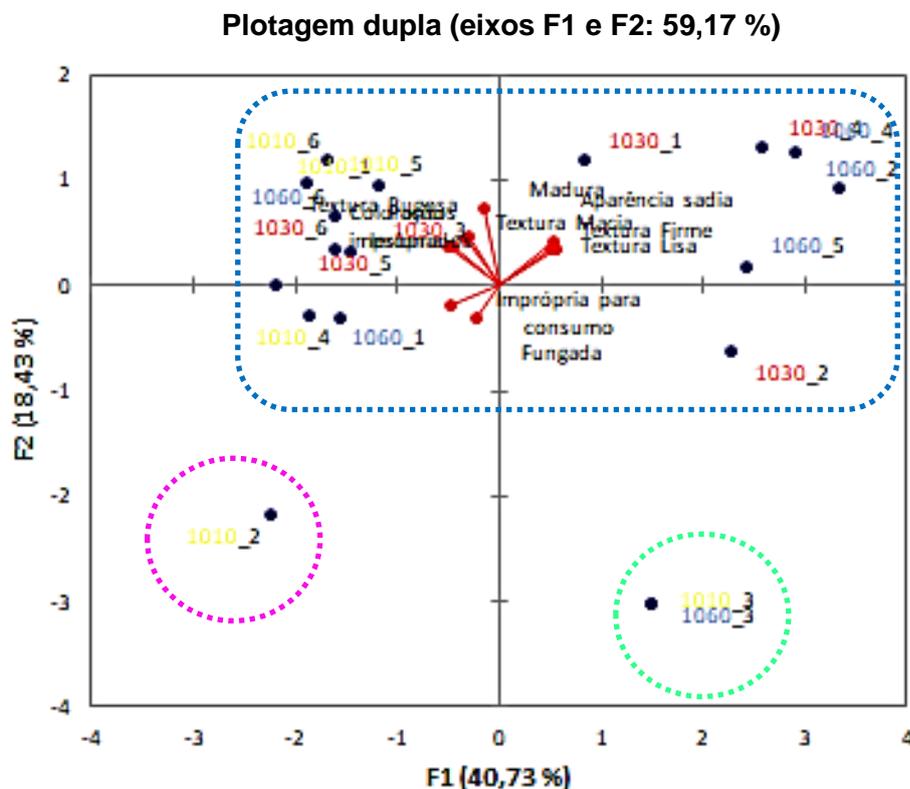
Os atributos eleitos como termos descritores em treinamento foram, Coloração imprópria; Aparência sadia; Fungada; Imprópria para consumo; Madura; Pontos lesionados; Textura firme; Textura lisa; Textura Macia e Textura rugosa.

Com a tabulação e plotagem dos termos descritores delineados pelos painelistas ao ADQ Clássico, foi possível verificar que as laranjas inteiras com e sem a adição do extrato de nêspera, nas três concentrações avaliadas, não apresentaram relação entre as amostras após trinta dias de armazenamento.

No Gráfico 6 as amostras estão discriminadas em três grupos, sendo um grupo composto por duas amostras que foram descartadas durante o experimento, porque foi verificado visualmente proliferação de fungos, outro grupo composto pela amostra que apresentou maior ocorrência do termo descritor “fungada” e o terceiro grupo, circulado por linha tracejada azul, com as demais quinze amostras sem apresentar discrepância dentre os descritores.

As amostras que foram descartadas estão circuladas no Gráfico 6 por linha tracejada de cor verde. Estas apresentaram proliferação de fungos no decorrer do experimento, desta forma o procedimento de descarte foi adotado para não comprometimento amostral global. A amostra 1010_3 (terceira laranja do grupo sem extrato) foi descartada no décimo quarto dia e a amostra 1060_3 (terceira laranja do grupo com 5 % de extrato) foi descartada no vigésimo segundo dia.

Gráfico 4 - Análise de componentes principais da análise ADQ das Laranjas



As amostras circuladas por linha tracejada de cor verde foram descartadas; a amostra circulada por linha tracejada de cor rosa não foi avaliada pelo tato; as amostras circuladas por linha tracejada de cor azul apresentaram similaridade entre os termos descritores.

A amostra 1010_2, considerada como o segundo grupo, está circulada no Gráfico 6 por linha tracejada de cor rosa, apresentou características que fez com que o painelista não a avaliasse pelo tato e sim por correlação às memórias sensoriais acessadas no treinamento pela apresentação de fotos, dos limiares máximos e mínimos atribuídos às laranjas sadias e senescentes. Em estudos anteriores evidenciou relação não construtivas das memórias sensoriais ao aplicar técnicas descritivas (Thuillier, 2007; Thuillier *et al.*, 2015). Assim, esta laranja proporcionou repulsa aos painelistas, por sua aparência senescente e degradada. No entanto, como instruídos em treinamento, os painelistas deveriam avaliar os frutos da forma e pelos parâmetros que julgassem convenientes, esta laranja então, foi avaliada por todos os painelistas pelo que eles imaginavam ser e não pela experiência do toque. Esta liberdade dada aos painelistas proporciona um fácil acesso às memórias sensoriais (Valentin e Nestrud, 2016).

De acordo com esta análise sensorial, o potencial antimicrobiano do extrato de nêspera aplicado por imersão na superfície das laranjas nas concentrações de 2,5 % e 5 % não diferiram com relação à concentração de 0 % de extrato.

Para um estudo de pós-colheita de frutos é importante ressaltar a dificuldade de adquirir laranjas com o mesmo grau de maturação. Este estudo avaliou a interação do extrato na superfície de laranjas com estágio similar de maturação pelo CCI. No entanto, os frutos 1010_3 e 1060_3 poderiam estar em um grau diferente de maturação quando comparado aos demais frutos analisados.

No caso da laranja 1060_3, o potencial antimicrobiano do ácido ursólico presente no extrato de semente de nêspera, utilizado na imersão do fruto em uma concentração de 5 %, não impediu ou retardou a evolução pós-colheita. Na laranja 1010_3, não houve adição de extrato na solução de imersão e apenas uma das seis laranjas do lote, assim como no lote 1060, teve que ser excluída, para o não comprometimento das laranjas alocadas ao redor. Desta forma reafirma-se a possibilidade das laranjas estarem em diferentes graus de maturação.

4.3 ANÁLISES DOS SUCOS DE LARANJA

4.3.1 Compostos Fenólicos totais

Foram calculados os fenólicos totais presentes no suco de laranja das três linhas de cada um dos três lotes. Os valores apresentados na Tabela 13 são as médias calculadas em triplicada analítica, levando em consideração a equação da reta $y=0,0641x+0,0088$ e o coeficiente de regressão linear de $R^2 = 0,9999$.

Tabela 10 - Fenólicos totais nos sucos

Linha	Lote C	Lote B	Lote A
	0 dias $\mu\text{g GAE.g}^{-1}$	15 dias $\mu\text{g GAE.g}^{-1}$	30 dias $\mu\text{g GAE.g}^{-1}$
1	$10,4545 \pm 0,19^{aA}$	$10,8081 \pm 0,25^{aA}$	$10,7457 \pm 0,27^{aA}$
2	$15,2179 \pm 0,22^{bA}$	$14,2194 \pm 0,13^{bB}$	$14,0530 \pm 0,19^{bB}$
3	$19,1492 \pm 0,22^{cA}$	$16,0083 \pm 0,26^{cB}$	$15,4051 \pm 0,50^{cB}$

Lote C, com 0 dias de armazenamento; Lote B, com 15 dias de armazenamento e Lote A, com 30 dias de armazenamento; linha 1, com 0 % de extrato, linha 2, com 2,5 % de extrato e linha 3, com 5 % de extrato; Médias com os respectivos desvio padrão estão seguidos de letras minúsculas diferindo na coluna e letras maiúsculas diferindo nas linhas, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); n amostral é igual a 3.

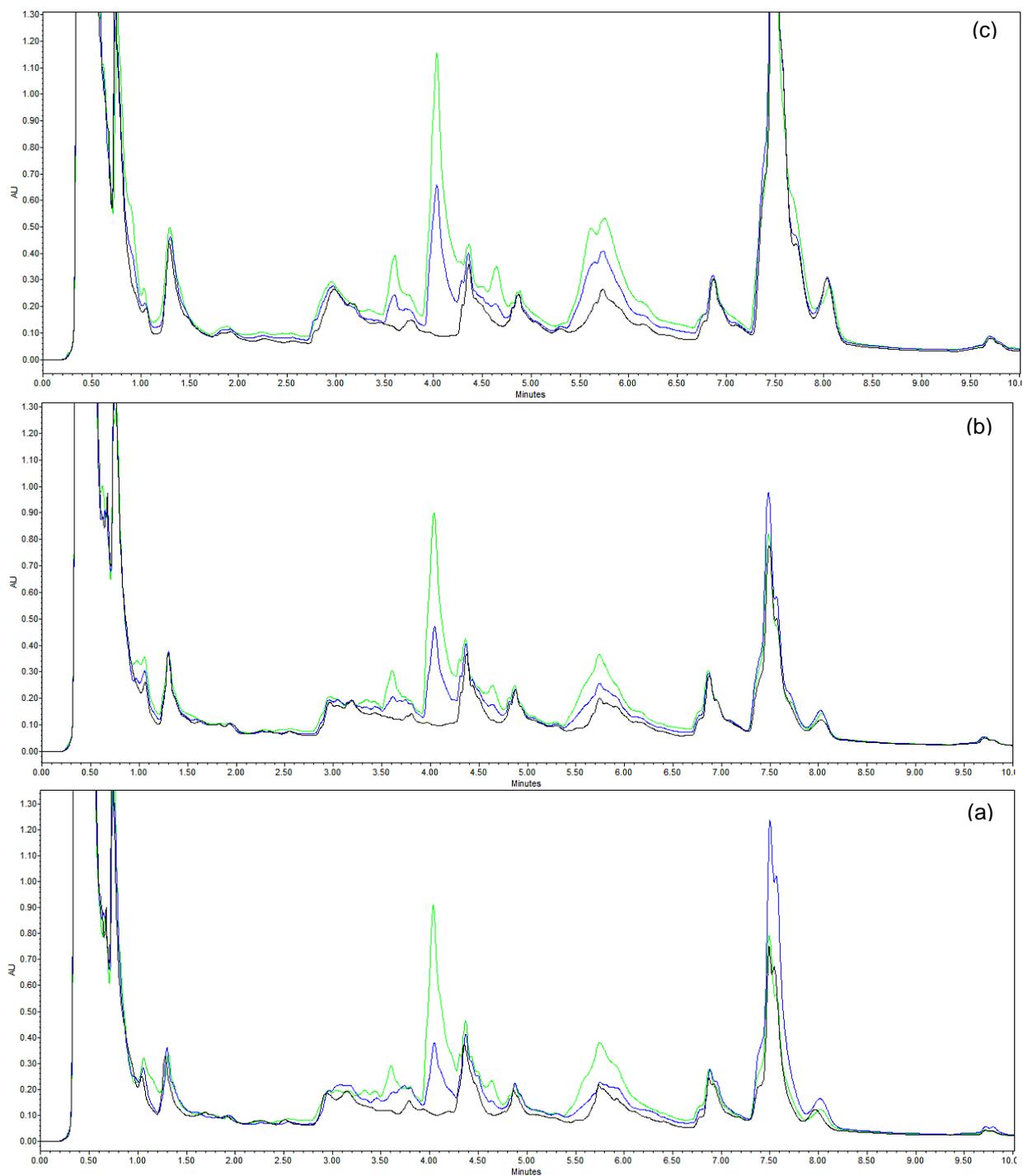
Quando analisada a linha 1 é possível verificar que não houve diferença significativa no decorrer do tempo ($p > 0,05$).

As linhas 2 e 3 do lote C, apresentaram maior valor de fenólicos totais, respectivamente, $15,2179 \pm 0,22$ e $19,1492 \pm 0,22 \mu\text{g GAE.g}^{-1}$. No entanto, foi verificada uma redução significativa ($p > 0,05$) no valor de fenólicos totais de ambas as linhas no decorrer dos primeiros 15 dias de estocagem, com o equilíbrio destes valores nos 15 dias subsequentes.

Estes valores apontam que no decorrer dos primeiros 15 dias de estocagem, nas linhas 2 e 3 houve reação química envolvendo compostos fenólicos, caracterizando uma possível atividade antimicrobiana.

4.3.2 Concentração de ácido ursólico

A concentração de ácido ursólico presente nos sucos de laranja, das três linhas dos três lotes elaborados foi quantificada pela realização da análise cromatográfica por UPLC. O Gráfico 7 apresenta os três lotes com o perfil cromatográfico das três linhas.

Gráfico 5 - Perfil cromatográfico dos sucos

Perfil cromatográfico dos sucos de laranja; pico de ácido ursólico compreendido no intervalo do tempo de retenção de 3 minutos e 50 segundos a 4 minutos e 20 segundos; (c) Lote C, com 0 dias de armazenamento; (b) Lote B, com 15 dias de armazenamento e (a) Lote A, com 30 dias de armazenamento; a cor verde (●) corresponde ao suco da linha 3, com 5 % de extrato; a cor azul (●) corresponde ao suco da linha 2, com 2,5 % de extrato e a cor Roxa (●) corresponde ao suco da linha 1, com 0 % de extrato.

No Gráfico 7, os perfis cromatográficos das linhas estão representados pelas cores roxa, azul e verde, respectivas as linhas 1, 2 e 3. No intervalo do tempo de retenção compreendido de três minutos e cinquenta segundos até quatro minutos e vinte segundos, é possível observar o pico referente às concentrações de ácido ursólico presente nos sucos.

A curva referente a linha 1, com 0 % de extrato de semente de nêspira teve como valor médio aos 3 lotes, a absorvância de 0,096. Este valor de absorvância foi estipulado como sendo o valor de linha base ao ácido ursólico, ou seja, nos valores das absorvâncias das linhas 2 e 3 dos lotes A, B e C, o valor de 0,096 foi subtraído e o valor resultante desta subtração foi equacionado aos valores da reta de regressão linear para constatação da concentração de ácido ursólico em cada um dos sucos.

Na Tabela 14 estão apresentados os valores referentes ao ácido ursólico nos lotes e linhas de suco de laranja.

Tabela 11 - Concentração de ácido ursólico nos sucos de laranja

		Absorbância	Ácido Ursólico (mg.100mL ⁻¹)
	Linha 1	0,10	0,00
Lote C	Linha 2	0,90	0,21
	Linha 3	1,30	0,70
	Linha 1	0,10	0,00
Lote B	Linha 2	0,49	0,28
	Linha 3	0,90	0,67
	Linha 1	0,09	0,00
Lote A	Linha 2	0,39	0,47
	Linha 3	0,91	0,88

Lote C, com 0 dias de armazenamento; Lote B, com 15 dias de armazenamento e Lote A, com 30 dias de armazenamento; linha 1, com 0 % de extrato, linha 2, com 2,5 % de extrato e linha 3, com 5 % de extrato.

Nos sucos da linha 1, sem adição de extrato, os valores encontrados em absorvância demonstraram a linearidade no decorrer dos trinta dias, representando a repetibilidade dos lotes e a estabilidade das amostras.

A Linha 2, teve a maior variação de concentração no decorrer do tempo, iniciando o período avaliado com $0,47 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ (Lote C) e terminando os trinta dias avaliados com $0,21 \text{ mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ (Lote A), o que demonstra a diminuição do ácido ursólico ao longo do armazenamento.

Na linha 3, houve decréscimo na concentração de ácido ursólico nos primeiros quinze dias e nos quinze dias subsequentes apresentou valores similares, o que demonstra estabilidade no armazenamento.

Não há relatos da aplicação de ácido ursólico em produtos alimentícios, mas estudos de compostos orgânicos com potencial antimicrobiano aplicado em alimento processado, apresentam que a ação destes compostos sofrem interferência da temperatura e do pH (Stojković *et al.*, 2013; Fi, 2014; López-Hortas *et al.*, 2018). Os sucos deste estudo permaneceram na mesma temperatura de armazenamento e demonstraram diferentes variações quanto à concentração de ácido ursólico. A diminuição observada na linha 2 pode ser justificada pela ação antimicrobiana do ácido ursólico, que reage neutralizando as espécies reativas de oxigênio - ROS liberados em reações microrgânicas (Stojković *et al.*, 2013).

4.3.3 Ratio

Para estabelecer o ratio dos sucos de laranja foi calculada a relação entre a acidez e os sólidos solúveis presentes na bebida. A Tabela 15 apresenta os resultados das análises refratométrica e titulométrica e sua consecutiva interação.

Tabela 12 - Interação analítica ao Ratio

Lotes	Linhas	Sólidos Solúveis	Acidez titulável	Ratio
		°B	Gramas de ácido cítrico anidro em 100 ml de suco	°B / Acidez
C	1	8,5	0,35 ± 0,15	26,04 ^c
	2	8,4	0,36 ± 0,00	25,10 ^c
	3	8,6	0,37 ± 0,00	24,65 ^c
B	1	9,5	0,50 ± 0,01	20,32 ^b
	2	9,5	0,49 ± 0,01	20,92 ^b
	3	9,2	0,49 ± 0,00	20,87 ^b
A	1	9,3	0,58 ± 0,00	16,97 ^a
	2	9,5	0,57 ± 0,00	17,79 ^a
	3	9,4	0,56 ± 0,01	17,86 ^a

Lote C, com 0 dias de armazenamento; Lote B, com 15 dias de armazenamento e Lote A, com 30 dias de armazenamento; linha 1, com 0 % de extrato; linha 2, com 2,5 % de extrato e linha 3, com 5 % de extrato; médias com os respectivos desvio padrão; grau Brix (°B); os valores de ratio estão apresentados seguidos de letras que diferem os resultados dos sucos de laranja pelo teste de Tukey, com 5% de significância; n amostral é igual a 3.

Apesar do ratio ser a relação de maior impacto dentre o comportamento analítico dos frutos cítricos, deve ser observada a origem dos frutos analisados, pois os valores estabelecidos como padrão à uma determinada região produtora destes frutos, não necessariamente, serão adequados aos frutos utilizados neste experimento (Almeida, 2013).

Os valores de Ratio considerados como ideais à palatabilidade de sucos de laranja, pelo Centro de Isótopos Estáveis Ambientais da Universidade Estadual Paulista, são os valores compreendidos entre quinze e dezoito (Figueira *et al.*, 2010). No entanto, apenas o lote A com 30 dias de armazenamento, enquadra-se nesta classificação. Desta forma, para este estudo, o lote C foi considerado como detentor dos valores ideais de ratio, pois, com 0 dias de armazenamento apresentou valores com similaridade estatística.

As interações proporcionadas ao organismo humano pelo ratio são responsáveis pela percepção do sabor e do grau de maturação dos frutos cítricos, esta relação é detectada nos receptores palatáveis da boca humana. O ratio é o principal limiar em um processo produtivo de produtos cítricos e de acordo com os resultados

apresentados na Tabela 15 foi possível verificar alterações descritivas quanto a aceitação das linhas do Lote A, com 30 dias de estocagem, visto que com o passar do tempo de armazenamento os valores de ratio foram diminuindo (Figueira *et al.*, 2010; Almeida, 2013; Ufrgs, 2017).

4.3.4 Açúcares totais

Os valores de açúcares totais nos sucos de laranja estão apresentados na Tabela 16, onde, as concentrações em porcentagem nas linhas e lotes possibilita evidenciar a diferença estatística da linha 1 durante o período de armazenamento, onde no dia inicial do armazenamento esta amostra apresentava valor de $5,77 \pm 0,00$ % de açúcares totais e com 30 dias de armazenamento a porcentagem de açúcares totais nesta linha era de $4,82 \pm 0,00$, um decréscimo de 0,95 %. As outras duas linhas também apresentaram decréscimo na porcentagem de açúcar em 0,35 %.

Tabela 13 - Açúcares totais em sucos de laranja

Linha	Lote C	Lote B	Lote A
	0 dias	15 dias	30 dias
	Açúcares Totais (%)		
1	$5,77 \pm 0,00^{aA}$	$5,91 \pm 0,00^{aA}$	$4,82 \pm 0,00^{bB}$
2	$5,88 \pm 0,00^{aA}$	$6,11 \pm 0,00^{aB}$	$5,53 \pm 0,00^{aC}$
3	$5,82 \pm 0,00^{aA}$	$5,92 \pm 0,00^{aA}$	$5,47 \pm 0,00^{aB}$

Lote C, com 0 dias de armazenamento; Lote B, com 15 dias de armazenamento e Lote A, com 30 dias de armazenamento; linha 1, com 0 % de extrato, linha 2, com 2,5 % de extrato e linha 3, com 5 % de extrato; Médias com os respectivos desvio padrão estão seguidos de letras minúsculas diferindo na coluna e letras maiúsculas diferindo nas linhas, pelo teste de Tukey (p > 0,05), n amostral é igual a 2.

Por detectar os açúcares totais naturais da laranja este resultado também pode evidenciar possíveis fraudes e adulterações em processos produtivos. O método de Lane-Eynon, realizado nesta análise de açúcares totais, baseia-se no fato de que as aldoses ou cetoses transformam os sais cúpricos da solução tartárica em sais cuprosos vermelhos. Esta reação ocorre por redução em meio aquecido, onde, estes sais precipitam logo após perder sua cor inicialmente azul. O complexo formado com a reação do tartarato com o cobre é solúvel, ao contrário do óxido cuproso que é

insolúvel e formado ao reagir juntamente ao cobre livre no meio reacional, identificando assim todo açúcar presente no meio (Litwack, 1967).

Com os resultados da Tabela 16, verifica-se que a introdução dos extratos nas formulações dos sucos de laranja apresentou às linhas 2 e 3, variação similar da porcentagem de açúcares totais no decorrer dos 30 dias de estocagem. O ácido pode ter reagido com o suco de laranja ou com os reagentes da solução tartárica evitando a redução dos sais cúpricos, mesmo em concentrações diferentes no suco de laranja.

A adição de extrato de semente de nêspera não elevou a quantidade de açúcares presentes no suco de laranja atendendo a legislação vigente que estabelece o limiar máximo de açúcares totais naturais da laranja, em 13 g de açúcar por 100 g de suco, ou seja 13 % (Brasil, 2000).

4.3.5 Atividade de água

A avaliação de atividade de água nos lotes e linhas do suco de laranja é apresentada na Tabela 17.

Tabela 14 - Atividade de água a_w em sucos de laranja

Linha	Lote C	Lote B	Lote A
	0 dias	15 dias	30 dias
	a_w		
1	0,99 ± 0,00 ^{aA}	0,93± 0,04 ^{aA}	0,92 ± 0,00 ^{aA}
2	0,99 ± 0,00 ^{aA}	0,99± 0,00 ^{aA}	0,93 ± 0,00 ^{aA}
3	0,99 ± 0,00 ^{aA}	0,99± 0,00 ^{aA}	0,99 ± 0,00 ^{bA}

Lote C, com 0 dias de armazenamento; Lote B, com 15 dias de armazenamento e Lote A, com 30 dias de armazenamento; linha 1, com 0 % de extrato, linha 2, com 2,5 % de extrato e linha 3, com 5 % de extrato; Médias com os respectivos desvio padrão estão seguidos de letras minúsculas diferindo na coluna e letras maiúsculas diferindo nas linhas, pelo teste f ($p > 0,05$), n amostral é igual a 3.

Os valores de atividade de água dentre as linhas se comportaram de forma distinta. A linha 1, no decorrer de trinta dias, apresentou uma redução de 0,07 atividade de água, demonstrando que 7 % da água que estava “não ligada” no primeiro dia de

estocagem, estabeleceu ligações no meio reacional do suco de laranja sem adição do extrato. Redução similar ocorreu na linha 2 e nenhuma alteração foi observada nos valores da linha 3. A análise de variância não encontrou diferença significativa entre os valores das linhas e lotes ($p > 0,05$).

Analisando o lote C em relação a linha 3, é possível observar que a concentração de 5 % de extrato de nêspera na formulação dos sucos de laranja, estabiliza a proporcionalidade entre as moléculas de água no meio reacional, ou seja, o grau de hidratação da água. A atividade de água – a_w pode ser classificada como fração de água livre ou disponível contrapondo a água ligada aos solutos como os açúcares ou polióis; pode também, ser explicada pela estrutura ou ordenação das moléculas de água na presença dos solutos ou mesmo a abordagem que considera o grau de hidratação da água, esta leitura é resultante dos modelos estequiométricos de avaliação da aglutinação e das ligações entre a água e o solutos (Maneffa *et al.*, 2017).

4.3.6 Potencial hidrogeniônico

As médias dos resultados obtidos para as amostras quanto ao potencial hidrogeniônico dos sucos de laranja estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 15 - Potencial hidrogeniônico - pH

	Lote C	Lote B	Lote A
	0 dias	15 dias	30 dias
Linha	pH		
1	4,02 ± 0,01 ^{aA}	4,26 ± 0,00 ^{aB}	4,46 ± 0,01 ^{aC}
2	4,01 ± 0,00 ^{aA}	4,24 ± 0,00 ^{aB}	4,63 ± 0,12 ^{aC}
3	4,00 ± 0,04 ^{aA}	4,22 ± 0,00 ^{aB}	4,51 ± 0,00 ^{aC}

Lote C, com 0 dias de armazenamento; Lote B, com 15 dias de armazenamento e Lote A, com 30 dias de armazenamento; linha 1, com 0 % de extrato, linha 2, com 2,5 % de extrato e linha 3, com 5 % de extrato; Médias com os respectivos desvio padrão estão seguidos de letras minúsculas diferindo na coluna e letras maiúsculas diferindo nas linhas, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), n amostral é igual a 3.

Durante as avaliações quinzenais houve aumento da hidrogenação do meio. É sabido, que sais utilizados na indústria de alimentos como conservadores têm na sua forma de ação a liberação de íons no meio reacional como sequestrantes de radicais livres (Stojković *et al.*, 2013)

Ao avaliar os resultados do pH, observou-se diferença entre os lotes, ou seja, ao aumento do pH no suco não foi afetado pela adição do extrato e sim pelo passar do tempo de armazenamento. O lote C foi o mais ácido, quando comparado aos outros dois lotes. No entanto, os lotes C, B e as linhas 1 e 3 do lote A podem ser classificados como um alimento ácido, pois a acidez na faixa de 4,0 a 4,5 corresponde à alimentos de baixa acidez, mas o lote A linha 2 é classificado como um alimento pouco ácido, pois o pH foi superior a 4,5.

O suco de laranja é um alimento ácido, o que colabora para o baixo ponto de hidrogenação. Com o passar dos dias o pH dos sucos foi aumentando e ao final dos 30 dias a linha 2 apresentou a maior variação em valor do período estudado, esta progressão pode ser oriunda de reações bioquímicas ou mesmo químicas.

4.3.7 Avaliação microbiológica

Os controles negativos para a identificação de coliformes totais e termotolerantes, de *Salmonella ssp.* e bolores e leveduras foram estabelecidos por meio de cultura sem adição de microrganismo e incubação nas mesmas condições dos meios de cultura adicionados das amostras.

4.3.7.1 Coliformes totais e termotolerantes

No teste confirmativo, em EC e VB não houve formação de gás em nenhum tubo de ensaio ao final das 24 - 48 horas, sendo o resultado 0 NMP para EC e VB, ou seja, negativo para coliformes totais e termotolerantes.

Para analisar os sucos de laranja com e sem adição do extrato de semente de nêspera em pentaplicata foram utilizados 180 tubos, houve formação de gás no interior de 14 tubo de Durham, no teste presuntivo em caldo LST, sendo o resultado positivo os tubos referentes às amostras Lote A linha 1, nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} , e

linha 3 na diluição 10^{-2} ; no Lote B linha 2, nas diluições 10^{-1} e 10^{-4} e na linha 3 na diluição 10^{-1} ; e no Lote C nas linhas 1 e 2, em todas as diluições e na linha 3 na diluição 10^{-1} .

A formação de gás no interior de alguns tubos de Durham no teste presuntivo se dá por este ser constituído de lactose, triptose, cloreto de sódio, fosfato monopotássico, fosfato dissódico e lauril sulfato de sódio e os coliformes serem bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos que não esporulam, oxidase-negativos e capaz de se multiplicar juntamente a sais biliares ou agentes tensoativos, estes microrganismos fermentam lactose e esta reação resulta na formação de ácido, gás e aldeído (Kasvi, 2018).

Para o teste confirmativo, todos os cinco tubos de ensaio referentes à pentaplicata da amostra positivo-presuntiva, foram replicadas nos caldos VB e EC.

A maioria das bactérias do grupo dos coliformes pertencem aos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*. Dentre estes gêneros, há uma parcela que apresenta maior resistência térmica, sendo denominados termotolerantes. O teste em caldo EC corresponde à abordagem destes microrganismos que são classificados assim, por fermentarem a lactose e manitol a uma temperatura de $44,5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) em 24 horas, além de produzir indol via triptofano, por serem oxidase negativa, não hidrolisador de ureia e apresentar atividade as enzimas β -galactosidase e β -glucoronidase. A *E. coli* é considerado um dos microrganismos indicativo de contaminação fecal (Funasa, 2013).

Segundo o Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos contaminados do Ministério da Saúde, a bactéria *E. coli* deve estar ausente em alimentos por ser um dos agentes etiológicos mais comuns às Doenças Transmitidas por Alimentos - DTAs, e por apresentar risco a saúde, alteração na qualidade da água e de alimentos (Saúde, 2010).

4.3.7.2 *Salmonella* spp.

Na análise de *Salmonella*, fatores de armazenamento ou processamento do suco de laranja poderiam lesionar as possíveis células deste microrganismo, assim o suco foi pré-enriquecido em caldo não seletivo, para que as possíveis células se tornassem

viáveis à seleção nos meios específicos utilizados na sequência analítica. Se a amostra fosse incubada diretamente em substâncias seletivas, os microrganismos lesionados não teriam resistência para proliferar. Nesta etapa de pré-enriquecimento foi utilizado o caldo lactosado, pois a lactose não é comumente fermentada pela *Salmonella spp* e convém a ser fonte de nutrientes (Brasil, 2011). Após o pré-enriquecimento para a análise de *Salmonella* foi realizada etapa de enriquecimento seletivo com os caldos TT e RSV, abrangendo assim diversas variações de resistência da *Salmonella spp.* aos agentes seletivos.

O caldo TT é constituído por tetracionato, proporcionou a seleção das sorovares de *Salmonellas spp.* com características tetracionato-redutase, incluindo a *S. Typhi*; e o RSV possui em sua composição o cloreto de magnésio e verde malaquita que atua como inibidor de microrganismos competitivos, selecionando cepas de *Salmonella spp.* exceto a *S. Typhi* (Brasil, 2011).

Na etapa de meios seletivos HE, SS e XLD os resultados foram negativos. Assim, não foi possível observar a presença de *Salmonella spp.* nos sucos de laranja com e sem adição de extrato.

O resultado é ausência de *Salmonella spp.* em 25 mL de todas as amostras de suco de laranja avaliadas neste estudo.

Não houve formação de colônias características, pois, para que a colônia seja classificada como característica esta deveria ter apresentado coloração negra nos meios seletivos, pois este microrganismo tem a capacidade de produzir sulfeto de hidrogênio que reage com o citrato férrico e tiosulfato de sódio formando o sulfato ferroso (Brasil, 2011; Gómez Álvarez, 2012). No entanto, nenhuma das colônias formadas apresentou tal característica.

4.3.7.3 Contagem total de bolores e leveduras

O resultado da análise de Bolores e Leveduras em todas as amostras de suco analisadas foi $< 1,0 \times 10^2$ UFC/ml, atendendo as exigências para Suco de Laranja Concentrado padrão exportação, onde o limite tolerável para contagem de bolores e leveduras é de 100 UFC/ml (ou $1,0 \times 10^2$ UFC/ml).

Os valores resultantes desta análise são aceitáveis, visto que Silva e Fonseca, (1999) evidenciaram que o período útil do suco de laranja se encerra quando a análise de bolores e leveduras apresenta 1 UFC na diluição 10^{-4} .

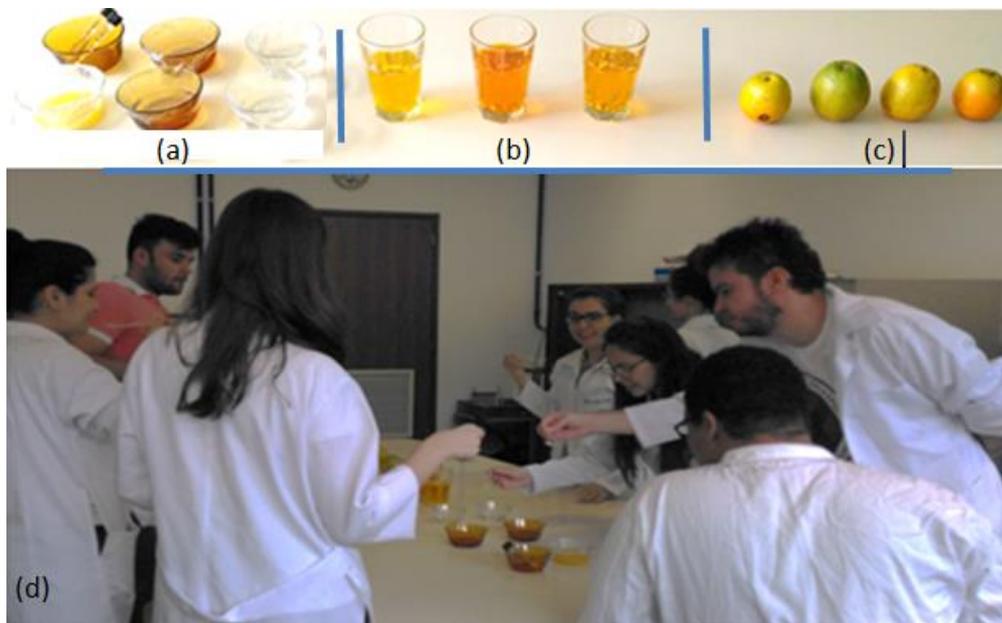
Não há relatos de concentrações ideais à inibição de microrganismos em alimentos por extrato de nêspera (López-Hortas *et al.*, 2018). A amostra contendo suco de laranja e 2,5 % de extrato de nêspera, foi a única em que não houve formação de nenhuma colônia de bolores e leveduras e este resultado corrobora com os resultados encontrados neste estudo, sendo está a amostra que apresentou as melhores respostas ao potencial antimicrobiano, a concentração de compostos fenólicos, ao perfil da concentração de ácido ursólico e a maior variação do potencial hidrogeniônico. Sendo esta, a concentração ideal, nos sucos de laranja estudados, ao potencial antimicrobiano.

4.3.8 Análise sensorial dos sucos de laranja

4.3.8.1 Treinamento

Em treinamento aos testes *Pivot Profile* e *Projective Mapping*, os painelistas foram apresentados aos limiares máximos e mínimos de cada atributo amostral do suco de laranja, conforme Imagem 6.

Imagem 5 - Apresentação dos limiares aos painelistas



(a) seis frascos contendo: 1º dois tubos de ensaio com respectivos limiares máximo e mínimo do odor de extrato de nêspera; 2º suco de laranja puro; 3º e 4º limiares máximo e mínimo do atributo doçura; 5º e 6º limiares máximo e mínimo do atributo acidez; (b) 3 frascos contendo limiares máximo, intermediário e mínimo do atributo cor; (c) limiares máximo, intermediários e mínimo do atributo “maturação” das laranjas; (d) apresentação dos atributos aos painelistas .

Na Tabela 23 estão apresentadas as concentrações condicionadas a cada extremo dos termos descritores.

Tabela 16 - Limiares máximos e mínimos dos termos descritores

Descritor	Material	Chemical Abstracts Service (No. CAS)	Limiar mínimo	Limiar máximo
			Concentração em água g.L ⁻¹	
Doce	Sacarose	57-50-1	1 (0,1 %)	10 (1 %)
Ácido	Ácido cítrico	77-92-9	0,3 (0,03 %)	3 (0,3 %)
Extrato	Ácido ursólico	77-52-1	0,1 (0,01 %)	50 (5 %)
Suco de laranja	Laranja natural	-	100 (10 %)	1000 (100 %)

Os limiares máximos e mínimos apresentados em treinamento tem a finalidade de mostrar aos painelistas o que seria a concentração de um determinado composto

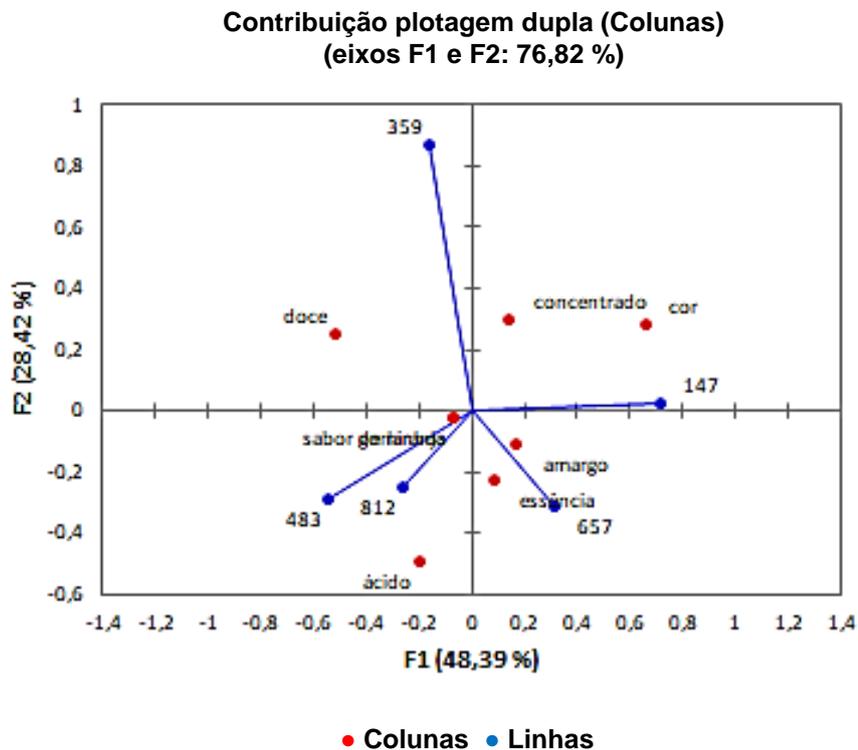
perceptível no alimento avaliado. Esta apresentação é realizada como um direcionamento ao painelista, ou seja, é um gabarito com atributos que ele possivelmente vai encontrar durante a avaliação sensorial. As soluções foram elaboradas com compostos alimentícios, levando em consideração os limiares adequados às características de um suco de laranja e os extremos regulamentados pela ABNT 8685 (Abnt, 2016).

4.3.8.2 *Pivot Profile dos sucos de laranja*

Diante dos resultados estabelecidos a cada termo descritor, a Análise de Correspondência - CA foi processada. A análise de CA aloca cada amostra e atributo em um sistema de coordenadas bidimensionais. A Tabela 24 apresenta a tabulação dos dados desta análise.

No Gráfico 8 é possível verificar que o Componente Principal 1 (F1) representa 48,39 % da variabilidade das amostras, resultando em um maior impacto aos termos descritores amargo, essência e ácido. Já o Componente Principal 2 (F2) apresenta 28,42 % de relevância às explicações analíticas amostrais, ou seja, os termos descritores “doce”, “sabor de laranja” e “gominhos” caracterizaram as amostras 359 e 483, que são as amostras com 0 % de extrato de nêspera, porém não apresentaram substancialidade ao conjunto amostral.

Gráfico 6 - Análise de correspondência bidimensional, *Pivot Profile*



483 e 359, amostras com 0 % de extrato de nêspera; 147, amostra com 1 % de extrato de nêspera; 657, amostra com 2,5 % de extrato de nêspera; 812, amostra com 5,0 % de extrato de nêspera.

Thuillier *et al.*, (2015) enfatizaram a importância da escolha da amostra pivot para o assertivo delineamento das amostras incógnitas. Em parâmetros bidimensionais a técnica *Pivot Profile* explicou 76,82 % da variância das respostas. Neste estudo foram inseridas duas amostras referência, que são a 483 e a 359, estas são as amostras com 0 % de extrato de nêspera, igualmente a amostra pivot, elas foram inseridas para estabelecimento da relação ao zero analítico. Estas amostras foram graficadas como componente principal 2, seus vetores se apresentam mais distantes do eixo 0,0 do que os vetores representativos às amostras com as diferentes concentrações de extrato.

Em um estudo, que analisou maçãs pela técnica sensorial descritiva de *Projective Mapping*, além da discriminação houve correlação entre as amostras por percepção genômica (Amyotte *et al.*, 2017). Similarmente, as amostras de suco de laranja com adição de extrato, que são as amostras 147 com 1 %, a 657 com 2,5 % e a 812 com

5,0 % de extrato de nêspera foram classificadas aos termos descritores como amostras similares entre si e distintas das amostras sem adição de extrato de nêspera.

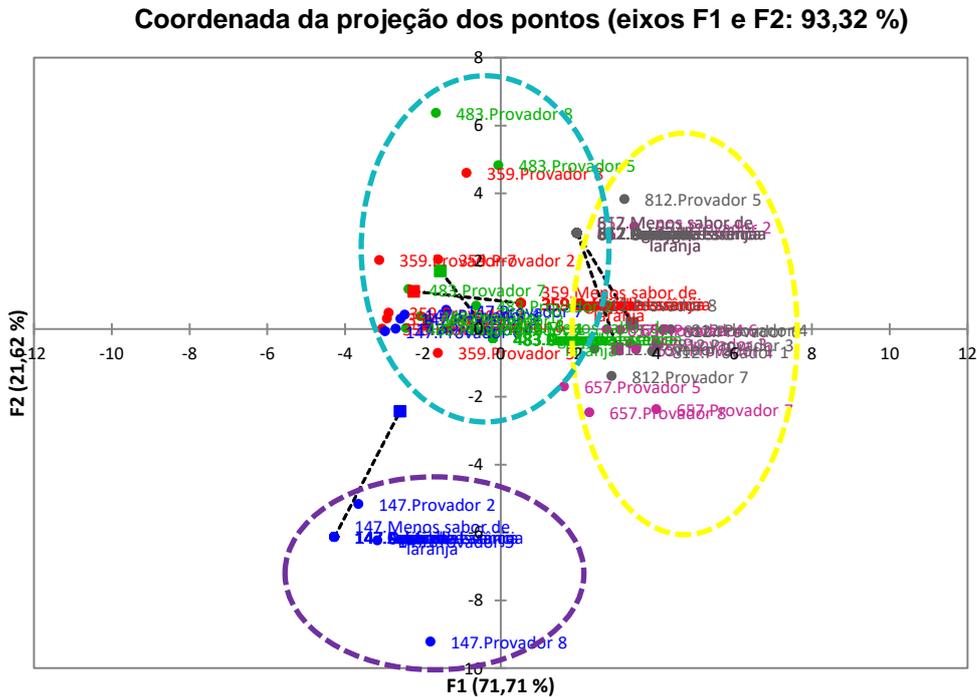
No entanto a amostra 812 apresentou maior correspondência ao termo descritor ácido, quando comparado às amostras 657 e 147. A sensibilidade dos painelistas foi capaz de estabelecer a proporção, em concentração de extrato, nas amostras ao termo descritor “ácido”, este termo foi pejorativamente elencado e atribuído às amostras 812 e 657, sendo a maior relevância dada a amostra 812 com a concentração de 5 % de extrato.

Por esta técnica foi possível verificar que as amostras com maior quantidade de extrato foram facilmente identificadas e que a amostra com 1 % de extrato de nêspera não apresentou relação direta ao termo descritor “ácido”, que foi o termo que apresentou maior impacto as amostras com maior concentração de extrato de nêspera.

4.3.8.3 Projective Mapping dos sucos de laranja

O Gráfico 9 apresenta a organização amostral conjunta dos painelistas às amostras.

Gráfico 7 - Coordenadas dos pontos projetados, *Projective Mapping*



A cor verde está correlacionada à amostra 483 com 0 % de extrato; a cor vermelha à amostra 359 com 0 % de extrato; a cor azul à amostra 147, com 1 % de extrato; a cor rosa à amostra 657, com 2,5 % de extrato e a cor roxa à amostra 812, com 5 % de extrato; os círculos delimitam os grupos formados, amarelo com adição de 2,5 e 5 % extrato; roxo com adição de 1 % de extrato e azul sem adição de extrato.

As amostras 483 e 359, com 0% de extrato, são representadas respectivamente pelas cores verde e vermelho, e foram identificadas como similares (circuladas pela linha tracejada azul), no entanto estas amostras apresentaram similaridade e posicionamento direcional à amostra 147 (circuladas pela linha tracejada roxa), representada no gráfico pela cor azul. Alguns termos descritores da amostra 147 foram alocados no terceiro quadrante, porém verifica-se um direcionamento vetorial ao segundo quadrante, onde estão alocadas as formulações com 0 % de extrato

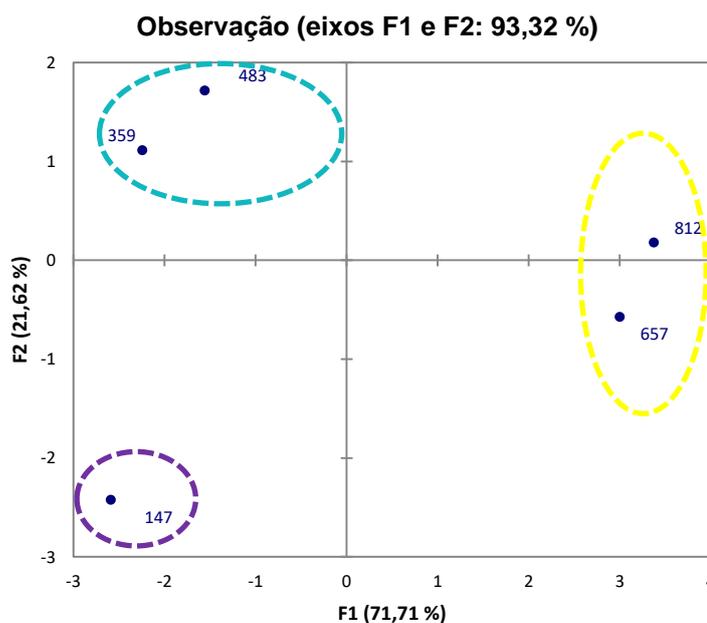
Segundo Balthazar *et al.*, (2017); Faria e Yotsuyanagi, (2002) a interpretação de um gráfico de Análise de Componente Principal – ACP com vetores direcionais, se dá observando onde a amostra está alocada e qual atributo é direcionado a ela por um vetor (Faria e Yotsuyanagi, 2002; Balthazar *et al.*, 2017).

Quanto as amostras 657 e 812, respectivamente às cores roxo e azul, houve progressão similar na abscissa e distinção na ordenada, mas tal distinção não caracterizou a separação do grupo dessas amostras (circuladas pela linha tracejada amarela), ou seja, as amostras com 2,5 % e 5 % de adição de extrato foram claramente diferenciadas do grupo amostral. No entanto, por uma possível saturação das papilas gustativas, ambas sofreram rejeição inicial e rapidamente classificadas como semelhantes por um atributo de desgosto.

Ao contrário deste estudo que foi realizado com painelistas não treinados Amyotte *et al.*, (2017) evidenciaram o delineamento amostral de textura de maçãs com painelistas treinados ao *Projective Mapping*, mas Valentin e Nestrud, (2016) explicam que esta técnica pode apresentar resultados assertivos tanto quanto um painel treinado quanto ao não treinado (Valentin e Nestrud, 2016; Amyotte *et al.*, 2017).

O Gráfico 10 apresenta a análise fatorial múltipla por contribuição dos escores amostrais.

Gráfico 8 - Análise fatorial múltipla, *Projective Mapping*



Amostras 483 e 359 com 0 %; amostra 147, com 1 % de extrato; amostra 657, com 2,5 % de extrato e amostra 812, com 5 % de extrato.

No Gráfico 10, tornam-se evidentes a distinção e similaridade dos grupos e é possível concluir que por esta técnica os painelistas discriminaram de forma precisa as amostras formuladas com maior adição de extrato (812 e 657) e de forma correlacionada às amostras sem adição de extrato com a amostra adicionada de 1 % de extrato na formulação (147), ou seja, os círculos pontilhados de cor roxa e de azul estão posicionados nos quadrantes negativos do plano cartesiano, enquanto o círculo amarelo, com as amostras 812 e 657, está alocado nos quadrantes 1 e 4.

Segundo Varela, Berget *et al.*, (2017) quando as amostras são apresentadas por grupos geometricamente afastados, o ruído amostral é minimizado, sem que seja necessário o cálculo por clusters, podendo ser considerado um resultado representativo do grupo amostral (Varela, Antúnez, *et al.*, 2017; Varela, Berget, *et al.*, 2017)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de recobrimento de laranjas por imersão foi assertiva, pois houve linearidade dos resultados pelo recobrimento integral dos frutos. No entanto, os compostos bioativos do extrato, quando diluído em água, não foi verificada ao avaliar parâmetros de cor, perda mássica e propriedades mecânicas. Não havendo a proteção da cor do fruto, da firmeza da casca e com a perda mássica similar aos lotes com e sem extrato na solução de recobrimento, verificou que a maturação dos frutos ocorreu de forma similar nos três lotes estudados. A abordagem pela técnica de ADQ às laranjas, confirmou os resultados das análises físicas, não havendo diferença entre lotes e não sendo verificada a atividade antimicrobiana, fato este, constatado pela recorrência do termo “Fungada” dentre os termos descritores.

As análises deste estudo evidenciaram o potencial antimicrobiano do extrato hidroetanólico de semente de nêspera quando adicionado em suco de laranja na concentração de 2,5 %. Esta característica pode ser justificável pela presença de ácido ursólico no meio reacional, sendo que a concentração nesta linha apresentou variação com o passar dos 30 dias analisados de forma mais vigorosa do que na linha 3. Esta característica vislumbra uma possível estabilização do ácido ursólico no meio reacional da linha 3 com 5 % de extrato e um potencial antimicrobiano ativo na linha 2 com 2,5 % de extrato.

Perante os resultados das análises sensoriais do suco de laranja, é possível concluir que o extrato de semente de nêspera é perceptível nas concentrações 2,5 % e 5 %, possivelmente influenciável pela relação entre sólidos solúveis e acidez titulável, denominada por ratio. No entanto, a concentração de 1 % de extrato no suco de laranja apresentou direcionamento vetorial pela técnica de *Projective Mapping*.

Este estudo é pioneiro e evidenciou a possibilidade de aplicação do extrato hidroetanólico da semente da nêspera em uma matriz alimentar, pois há similaridade sensorial entre a amostra com 1 % de extrato e as amostras de suco de laranja integral. Desta forma é recomendada a busca por novas matrizes alimentares que se adaptem ao ácido ursólico, pelas concentrações ideais de extrato de semente de nêspera ao alimento estudado e novas formas de ativação hídrica deste antimicrobiano.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, E.; DAOUD, Z.; ROULA, A. Leaf and branch extracts of *Eriobotrya japonica* exert antibacterial activity against ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 1, p. 120-128, 2011. ISSN 0975-0185.

ABNT. **Análise sensorial — Guia geral para a seleção, treinamento e monitoramento de avaliadores selecionados e de especialistas ou experts**. **ABNT NBR ISO 8586**. (ABNT), A. A. B. D. N. T.: 38 p. 2016.

ALMEIDA, M. M. C. D. SUCO CONCENTRADO DE LARANJA E SEUS SUBPRODUTOS. **UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ** 2013.

AMARAL, A. P. C. D. Estudo da secagem de maçãs: utilização de pré-tratamentos. **Universidade do Rio Grande do Sul**, 2014.

AMERINE, M. A.; PANGBORN, R. M.; ROESSLER, E. B. Principles of Sensory Evaluation of Food. **Academic press**, 1965.

AMINLARI, L.; MOHAMMADI HASHEMI, M.; AMINLARI, M. Modified Lysozymes as Novel Broad Spectrum Natural Antimicrobial Agents in Foods. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. R1077-R1090, 2014. ISSN 0022-1147.

AMYOTTE, B. et al. Mapping the sensory perception of apple using descriptive sensory evaluation in a genome wide association study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. <xocs:firstpage xmlns:xocs=""/>, 2017. ISSN 19326203.

ANVISA, A. N. V. S. Consolidado de aditivos alimentares. Acesso em: 25/05/2018.

AOAC. **AOAC - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16. Gaithersburg: 1997.

AOAC, A. O. A. C. **Official methods of analysis**. 2007.

ARAMBARRI, A. M.; HERNÁNDEZ, M. P. Variación estacional de saponinas en *Solidago chilensis* var. *chilensis* (Asteraceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 49, n. 4, p. 483-489, 2014. ISSN 0373580X.

ARAÚJO, L. D. Análise sensorial descritiva de cachaça: proposta de um protocolo preliminar para avaliação da qualidade da bebida. 2010. 129 (Mestre). Ciência e tecnologia de alimentos, **Universidade Federal de Viçosa**

ARES, G. et al. Polarized Projective Mapping: Comparison with Polarized Sensory Positioning approaches. **Food quality and preference**, v. 28, n. 2, p. 510-518, 2013. ISSN 0950-3293.

BALTHAZAR, C. F. et al. Prebiotics addition in sheep milk ice cream: A rheological, microstructural and sensory study. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 564-573, 2017. ISSN 1756-4646.

BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. Ultrasound and Antimicrobial Compounds: A Suitable Way to Control *Fusarium oxysporum* in Juices. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 6, n. 5, p. 1153-1163, 2013. ISSN 1935-5130.

BIER, M. C. J.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Biotransformation of limonene by an endophytic fungus using synthetic and orange residue-based media. **Fungal Biology**, v. 121, n. 2, p. 137-144, 2017. ISSN 1878-6146.

BOBIS, O. et al. Influence of phytochemical profile on antibacterial activity of different medicinal plants against gram-positive and gram-negative bacteria. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 51, n. 1, p. 113-118, 2015. ISSN 0003-6838.

BRANCO, P. et al. Antimicrobial properties and death-inducing mechanisms of saccharomycin, a biocide secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 101, n. 1, p. 159-171, 2017. ISSN 01757598.

BRASIL. LEI Nº 8.918, DE 14 DE JULHO DE 1994. A padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. 1994.

_____. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 01 - *Regulamento Técnico Geral para fixação dos*

Padrões de Identidade e Qualidade para Polpa de Fruta (e Suco de Fruta). **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**; 2000.

_____. Resolução - RDC 12. ANVISA, http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html. art. 11, inciso IV, do decreto 3029 2001.

_____. Manual técnico de diagnóstico laboratorial *Salmonella spp.* SAÚDE, Ministério da Saúde; Brasília - DF, 2011.

BRASIL, F. I. Antimicrobiano. 36: 31- 35 p. 2016.

CALLISTER, W. D. J. Ciência e Engenharia de materiais: Uma introdução. 5° edição. 2000.

CHA, D. et al. Anti-metastatic properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. **Archives of Pharmacal Research**, Heidelberg, v. 34, n. 3, p. 425-436, 2011. ISSN 0253-6269.

CHEN, G.-L. et al. Antioxidant activities and contents of free, esterified and insoluble-bound phenolics in 14 subtropical fruit leaves collected from the south of China. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 290-302, 2017. ISSN 1756-4646.

CHOLLET, S. et al. Sort and beer: Everything you wanted to know about the sorting task but did not dare to ask. **Food Quality and Preference**, v. 22, n. 6, p. 507-520, 2011. ISSN 0950-3293.

CONAB. Conjuntura Laranja. **Companhia Nacional de Abastecimento** http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_03_22_15_46_01_conjuntura_laranja_fevereiro_2017.pdf 2017.

COROLLARO, M. L. et al. Sensory profiling of apple: Methodological aspects, cultivar characterisation and postharvest changes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 111-120, 2013. ISSN 0925-5214.

CUBERO, S. et al. Application for the estimation of the standard citrus colour index (CCI) using image processing in mobile devices. **Biosystems Engineering**, v. 167, p. 63-74, 2018. ISSN 1537-5110.

DALYNN, B. McFarland Standard. **BIOLOGICALS**, D. 2014.

DELFIANIAN, M.; ESMAEILZADEH KENARI, R.; SAHARI, M. A. Antioxidative effect of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit skin extract in soybean oil. **Food Science**

& Nutrition, v. 3, n. 1, p. 74-80, Jan 2015. ISSN 2048-7177 (Print)2048-7177 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.193> >.

DELFANIAN, M.; KENARI, R. E.; SAHARE, M. A. Influence of extraction techniques on antioxidant properties and bioactive compounds of loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.) skin and pulp extracts. **Food Science & Nutrition**, v. 3, n. 6, p. 179-187, 21/01/2015 2015. ISSN 2048-7177.

DELFANIAN, M.; KENARI, R. E.; SAHARI, M. A. Antioxidative effect of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit skin extract in soybean oil. **Food Science & Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 74-80, Jan 2015a. ISSN 2048-7177 (Print)2048-7177 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.193> >.

_____. Influence of extraction techniques on antioxidant properties and bioactive compounds of loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.) skin and pulp extracts. **Food Science & Nutrition**, v. 3, n. 6, p. 179-187, 21/01/2015 2015b. ISSN 2048-7177.

DEMATTE, M. et al. Individual Variability in the Awareness of Odors: Demographic Parameters and Odor Identification Ability. **Chemosensory Perception**, New York, v. 4, n. 4, p. 175-185, 2011. ISSN 1936-5802.

DEMATTE, M. L. et al. Food neophobia and its relation with olfactory ability in common odour identification. **Appetite**, v. 68, p. 112-117, 2013. ISSN 0195-6663.

DENEULIN, P. et al. Evaluation of the Pivot Profile©, a new method to characterize a large variety of a single product: Case study on honeys from around the world. **Food Research International**, v. 106, p. 29-37, 2018. ISSN 0963-9969.

DONG, H. et al. UP12, a novel ursolic acid derivative with potential for targeting multiple signaling pathways in hepatocellular carcinoma. **Biochemical Pharmacology**, 2014. ISSN 0006-2952.

ELOY, J. D. O. et al. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO URSÓLICO EM DISPERSÕES SÓLIDAS. **Química Nova**, v. 35, n. 1036-1040, 2012, 2012.

ERCISLI, S. et al. Some physicochemical characteristics, bioactive content and antioxidant capacity of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) fruits from Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 148, p. 185-189, 2012. ISSN 0304-4238.

ESMERINO, E. A. et al. Consumer-based product characterization using Pivot Profile, Projective Mapping and Check-all-that-apply (CATA): A comparative case

with Greek yogurt samples. **Food Research International**, v. 99, p. 375-384, 2017. ISSN 0963-9969.

FARIA, E. V. D.; YOTSUYANAGI, K. Técnicas de Análise Sensorial. 1. **Embrapa**, Campinas, SP: 2002. ISBN 85-7029-047-0.

Fl. Aplicação do ácido cítrico na indústria de alimento. BRASIL, **F. I.** 30: 96-103 p. 2014.

Fl, **F. I. B.** Dossiê Antimicrobiano. 36: 31- 35 p. 2016.

FIGUEIRA, R. et al. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E LEGALIDADE EM BEBIDAS DE LARANJA. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 0103-4235, p. 267-272, 2010.

FREDEL, M. C.; ORTEGA, P.; BASTOS, E. Propriedades mecânicas ensaios fundamentais. 1. **Cermat**, 2010.

FU, X. et al. Plastid structure and carotenogenic gene expression in red- and white-fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 1, p. 341, 2012.

FUNASA, F. N. D. S. Manual prático de análise de água. **Ministério da saúde**, 2013.

GANESH, V. et al. Electrostatic Spraying of Food-Grade Organic and Inorganic Acids and Plant Extracts to Decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on Spinach and Iceberg Lettuce. **Journal of Food Science**, Malden, USA, v. 77, n. 7, p. M391-M396, 2012. ISSN 0022-1147.

GENTILE, C. et al. Pomological Traits, Sensory Profile and Nutraceutical Properties of Nine Cultivars of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Fruits Grown in Mediterranean Area. **Plant Foods for Human Nutrition**, New York, v. 71, n. 3, p. 330-338, 2016. ISSN 0921-9668.

GRANATO, D.; NUNES, D. S. Determinação de Compostos Fenólicos totais: Comparação entre os métodos Azul da prússia e o Folin-Ciocalteu. In: ELSEVIER (Ed.). Análise química, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos. 1. Rio de Janeiro, v.1, 2016. cap. 9, p.537. ISBN 9788535283563.

GRUBER, J. et al. A conductive polymer based electronic nose for early detection of *Penicillium digitatum* in post-harvest oranges. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, n. 5, p. 2766-2769, 2013. ISSN 0928-4931.

GÓMEZ ÁLVAREZ, L. M. Evaluación de un producto a base de ácidos orgánicos frente a *E. coli* y *Salmonella* spp, en la desinfección de lechuga fresca. **Revista Lasallista de Investigación**, v. 9, n. 2, p. 122-132, 2012. ISSN 17944449.

HIBBELER, R. C. **Resistência dos materiais**. 7. São Paulo: 2010.

HOLANDA, V. B. D. et al. Análise sensorial e desenvolvimento de embalagem para aguardente de algaroba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, 2015.

HONG-XIA, X.; XIAO-YING, L.; JUN-WEI, C. Comparison of phenolic compound contents and antioxidant capacities of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 2013-2020, 2014. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s10068-014-0274-2> >. Acesso em: 21/03/2017.

IAC, I. A. D. C.-. Nêspira 2015.

INSTITUTE, C. C. A. L. S. Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Approved Standard 2010.

JANG, S.-M. et al. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 1, p. 113, 2009. ISSN 1567-5769.

JUNEJA, V. K.; DWIVEDI, H. P.; YAN, X. Novel Natural Food Antimicrobials *. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, v. 3, p. 381-403, 2012. ISSN 1941-1413.

KAMMOUN, M.; BEN ALI, Y.; BEZZINE, S. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Eriobotrya japonica* leaves extracts. **African Health Sciences** v. 15, n. 2, p. 613-620, 2015.

KASHYAP, D.; TULI, H. S.; SHARMA, A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. **Life Sciences**, v. 146, p. 201-213, 2016. ISSN 0024-3205.

KASVI. Lauril Sulfato Triptose. 2018. Disponível em: < <http://www.splabor.com.br/produto/caldo-lauril-triptose-modelo-k25-610085-kasvi/> >. Acesso em: 25/05/2018.

KIM, D.-I. et al. Screening of Some Crude Plant Extracts for Their Acaricidal and Insecticidal Efficacies. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 8, n. 1, p. 93-100, 2005. ISSN 1226-8615.

KIM, M. et al. Oral administration of loquat suppresses DMBA-induced breast cancer in rats. **Food Science and Biotechnology**, Heidelberg, v. 20, n. 2, p. 491-497, 2011. ISSN 1226-7708.

KIM, M.-J. et al. Neuroprotective effects of Eriobotrya japonica against β -amyloid-induced oxidative stress and memory impairment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 780-784, 2011. ISSN 0278-6915.

KOBA, K. et al. Effect of loquat (Eriobotrya japonica) extracts on LDL oxidation. **Food chemistry**, v. 104, p. 308-316, 2007. ISSN 0308-8146.

KORNACKI, J. L.; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. A. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. capitulo 9. AMERICAN e ASSOCIATION, P. H. 2013.

LEE, Y.-H. et al. Ursolic acid differentially modulates apoptosis in skin melanoma and retinal pigment epithelial cells exposed to UV-VIS broadband radiation. **Apoptosis**, v. 19, n. 5, p. 1-13, 2013. ISSN 13608185.

LEONARDO, V. et al. PROPOSTA EXPERIMENTAL DIDÁTICA PARA O ENSINO DE ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS. **Química Nova**, v. 39, n. 2, p. 245-249, 2016. ISSN 1678-7064 1059-3501.

LEWIS, K. New approaches to antimicrobial discovery. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 87-98, 2017. ISSN 0006-2952.

LI, S. Repeated-dose (28 days) oral toxicity study in rats of an antiacne formula (BC-AF) derived from plants. **Drug & Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 77-85, 2011. ISSN 01480545.

LITWACK, G. **Bioquímica Experimental: um manual de laboratório**: Barcelona: Espanha: 23 - 30 p. 1967.

LUBER, P. et al. Comparison of Broth Microdilution, E Test, and Agar Dilution Methods for Antibiotic Susceptibility Testing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1062, 2003. ISSN 0095-1137.

LÓPEZ-HORTAS, L. et al. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. **Food Research International**, v. 103, p. 130-149, 2018. ISSN 0963-9969.

MANEFFA, A. J. et al. Water activity in liquid food systems: A molecular scale interpretation. **Food Chemistry**, v. 237, n. C, p. 1133-1138, 2017. ISSN 0308-8146.

MARCELO, M.; NATALIA, H.; ADRIANA, G. Application of a Pivot Profile Variant Using CATA Questions in the Development of a Whey-Based Fermented Beverage. **Beverages**, v. 4, n. 1, p. 11, 2018. ISSN 2306-5710.

MCDONALD, S. et al. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 73-84, 2001. ISSN 03088146.

MEDEIROS, F. G. M. D. et al. COMPARAÇÃO DA QUALIDADE SANITÁRIA ENTRE AMOSTRAS DE *Peumus boldus* Molina INDUSTRIALIZADAS E ARTESANAIS DO MUNICÍPIO DE CURRAIS NOVOS, RN. **Holos**, v. 3, p. 41-46, 2012. ISSN 1807-1600.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. Sensory Evaluation Techniques. **Florida: CRC Press**, 1987.

MERCK. ficha de informações de segurança de produtos químicos - FISPC - reagente de fenol segundo folin-Ciocalteu 2017.

MINOLTA, K. Comunicação precisa da cor. 66, 2017.

MORAND, C. et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. **The American journal of clinical nutrition**, v. 93, n. 1, p. 73, 2011.

MURRAY, J. M.; DELAHUNTY, C. M.; BAXTER, I. A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. **Food Research International**, v. 34, n. 6, p. 461-471, 2001. ISSN 0963-9969.

NIELSEN, S. S. **Food Analysis**. Fourth edition. USA, 2009.

NIENABER, U.; SHELLHAMMER, T. High-pressure processing of orange juice: Kinetics of pectinmethylesterase inactivation. **Journal Of Food Science**, v. 66, n. 2, p. 328-331, 2001. ISSN 0022-1147.

OKINO-DELGADO, C. H.; FLEURI, L. F. Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**, v. 163, p. 103-107, 2014. ISSN 0308-8146.

OKONOGI, S. et al. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 839-846, 2007. ISSN 0308-8146.

PALLOTTINO, F. et al. Assessment of the mechanical properties of Tarocco orange fruit under parallel plate compression. **Journal of food engineering**, v. 103, n. 3, p. 308-316, 2011. ISSN 0260-8774.

PALOMBO, E. A.; SEMPLE, S. J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2, p. 151-157, 2001. ISSN 0378-8741.

PARK, J. et al. Antimicrobial spray nanocoating of supramolecular Fe(III)-tannic acid metal-organic coordination complex: Applications to shoe insoles and fruits. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. <xocs:firstpage xmlns:xocs=""/>, 2017. ISSN 20452322.

PEIXOTO, M. P. G. et al. LC-UV Assay Method and UPLC/Q-TOF-MS Characterisation of Saponins from *Ilex Paraguariensis* A. St. Hil. (Mate) Unripe Fruits. **Phytochemical Analysis**, Chichester, UK, v. 23, n. 4, p. 415-420, 2012. ISSN 0958-0344.

PEREZ G, R. M. et al. Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. **Phytomedicine**, v. 5, n. 1, p. 55-75, 1998. ISSN 0944-7113.

POWERS, J. J. Current Practices and Application of Descriptive Methods. **In Sensory Analysis of Foods**, n. 187-266, 1984.

PÉREZ-GREGORIO, M. R. et al. Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. **Food Control**, v. 22, n. 7, p. 1108-1113, 2011. ISSN 0956-7135.

RAO, B.; TANG, R.-C. Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activities using aqueous *Eriobotrya japonica* leaf extract. **Advances in Natural Sciences. Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 015014-015014, 2017. ISSN 2043-6254.

RASHED, K. N.; BUTNARIU, M. Isolation and antimicrobial and antioxidant evaluation of bio-active compounds from *Eriobotrya japonica* stems. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 1, p. 75-81, 2014. ISSN 22285881.

RISVIK, E. Sensory Analysis. **Sweden: Tecator AB.**, 1985.

RISVIK, E. et al. Projective mapping: A tool for sensory analysis and consumer research. **Food Quality and Preference**, v. 5, n. 4, p. 263-269, 1994. ISSN 0950-3293.

ROULA, A.-M. et al. Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Trigonella foenum-graecum* on Highly Drug-Resistant Gram Negative Bacilli. **Journal of Botany**, v. 2010, 2010. ISSN 2090-0120.

SAÚDE, Ministério da. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. **SAÚDE, M. D.** 2010.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. food phenolics: sources chemistry effects applications. **Technomic**, 1995.

SHANMUGAM, M. K. et al. Ursolic Acid Inhibits the Initiation, Progression of Prostate Cancer and Prolongs the Survival of TRAMP Mice by Modulating Pro-Inflammatory Pathways (UA Modulates Tumor Growth in TRAMP Mice). **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 7, n. 3, p. e32476, 2012.

SILVA, C. N. R. D.; FONSECA, F. J. D. A. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 153-161, 1999. ISSN 0101-2061.

SILVA, F. D. A. S. E.; DUARTE, M. E. M.; CAVALCANTI-MATA, M. E. R. M. Nova metodologia para interpretação de dados de análise sensorial de alimentos. **Engenharia Agrícola**, 2010. ISSN 0100-6916.

SILVEIRA, J. Q. et al. Pharmacokinetics of flavanone glycosides after ingestion of single doses of fresh-squeezed orange juice versus commercially processed orange juice in healthy humans. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 52, p. 12576, 2014.

SINGH, G.; AULAKH, P. S.; RATTANPAL, H. S. Determination of maturity and Genetic Diversity in Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Genotypes Based on Citrus

Colour Index. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. ISSN: 2319-7706, p. 577-586, 2017.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY**. 3. Canada: 2010.

STINCO, C. M. et al. Effect of orange juice's processing on the color, particle size, and bioaccessibility of carotenoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 6, p. 1447, 2012.

STOJKOVIĆ, D. et al. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3205, 2013.

STONE, H. et al. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technonology**, v. 28, n. 11, p. 24-34, 1974.

STONE, H.; SIDEL., J. L. Sensory Evaluation Practices. **Academic Press**, 1985.

STONES, H. et al. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technonology**, v. 28, n. 11, p. 24-34, 1974.

SULTANA, N. **Clinically useful anticancer, antitumor, and antiwrinkle agent, ursolic acid and related derivatives as medicinally important natural product**. J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 26: 616-642 p. 2011.

SÁEZ, J. S. et al. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 2, p. 170-176, 2010. ISSN 0266-8254.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOJI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 381-388, 2007. ISSN 0308-8146.

TAKATSUI, F. Sistema CIE LAB: análises computacional de fotografias. 2011. (Mestre). Faculdade de odontologia, **Universidade Estadual Paulista**, Araraquara.

THUILLIER, B. Rôle du CO₂ dans L'appréciation Organoleptique des Champagnes—Expérimentation et Apports Méthodologiques. **Université de Reims: Reims**, France 2007.

THUILLIER, B. et al. Pivot© profile: A new descriptive method based on free description. **Food Quality and Preference**, v. 42, p. 66-77, 2015. ISSN 0950-3293.

TORRES ALVAREZ, C. et al. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of orange essential oil and its concentrated oils. **CyTA: Journal of food**, v. 15, n. 1, p. 129-135, 2017. ISSN 1947-6345.

UFMG, U. F. M. G.-. IT 19.11-04 analisador atividade de água. **Laboratório de Bioquímica de Alimentos** da faculdade de farmácia 2018.

UFRGS. A feira _ padrões de identidade e qualidade. <http://www.ufrgs.br/afeira/produtos/frutas/vinho-tinto/definicao/padroes-de-identidade-e-qualidade>, 2017.

VALENTIN, D.; NESTRUD, M. Projective Mapping and Sorting Tasks. In **J. Hort, S. Kemp, & T. Hollowood**, v. Descriptive Analysis in Sensory Evaluation, n. 75083-0688, p. 1-19, 2016.

VARELA, P. et al. Influence of consumers' cognitive style on results from projective mapping. **Food Research International**, v. 99, p. 693-701, 2017. ISSN 0963-9969.

_____. Projective mapping based on choice or preference: An affective approach to projective mapping. **Food Research International**, v. 100, p. 241-251, 2017. ISSN 0963-9969.

VICENTE, E. et al. Selection of promising sweet potato clones using projective mapping. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, UK, v. 97, n. 1, p. 158-164, 2017. ISSN 0022-5142.

_____. Evaluation of the sensory characteristics of strawberry cultivars throughout the harvest season using projective mapping. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, UK, v. 94, n. 3, p. 591-599, 2014. ISSN 0022-5142.

WALASEK, M. et al. Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 186, n. C, p. 133-138, 2015. ISSN 0308-8146.

WILLIAMS, A. A.; CARTER, C. S. A Language and Procedure for the Sensory Assessment of Cox's Orange Pippin Apples. **J. of the Science of Food and Agriculture**, v. 281, p. 1090-1104, 1977.

WOZNIAK, L.; SKAPSKA, S.; MARSZALEK, K. Ursolic Acid--A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. **Basel: MDPI AG**. 20: 20614-20641 p. 2015.

WU, L. et al. Processing Technology Investigation of Loquat (*Eriobotrya japonica*) Leaf by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Combined with Chemometrics. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013. ISSN 19326203.

XU, H.-X.; CHEN, J.-W. Commercial quality, major bioactive compound content and antioxidant capacity of 12 cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits. **Journal of the science of food and agriculture**, v. Vol.91(6), p. 1057-63, 2011.

YILONG, L. Biological Activities of Extracts from Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.): A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1-16, 2016. ISSN 14220067.

ZHANG, Y. et al. *Celastrus Orbiculatus* Thunb. Reduces Lipid Accumulation by Promoting Reverse Cholesterol Transport in Hyperlipidemic Mice. **Lipids**, Berlin/Heidelberg, v. 51, n. 6, p. 677-692, 2016. ISSN 0024-4201.

ZHOU, C.-H. et al. Carotenoids in white and red fleshed loquat fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7822-7830, 2007. ISSN 00218561.