

AVALIAÇÃO DO EXTRATO DA NÊSPERA (*Eriobotrya japônica* Lindl.) EM RECOBRIMENTO DE LARANJAS POR ANÁLISES FÍSICAS

AMANDA NERIS DOS SANTOS¹, VICTOR LUIZ MELO DUTRA², CAMILA ARGENTA FANTE³

¹ Mestranda, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – PPGCA, no Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia – FAFAR, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

² Mestrando, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – PPGCA, no Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia – FAFAR, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

³ Professora Adjunta, Faculdade de Farmácia – FAFAR, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

RESUMO:

Com a extração de compostos bioativos do fruto da nêspera, a análise de cromatografia líquida de alta performance – UPLC verificou a presença do ácido ursólico e características estáveis em diluições amostrais, com isso a aplicação deste extrato foi realizada em recobrimento de laranjas. A avaliação física dos frutos aferiu a deformação, a massa, e a cor por um período de trinta dias com três leituras analíticas. Estes dados evidenciaram que não houve diferença estatística entre as amostras com as concentrações aplicadas neste recobrimento.

Palavras-chave: Laranja, bioativos e nêspera.

Introdução

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 reage com o microrganismo causando alterações destrutivas (Abdou *et al.*, 2011; Arambarri e Hernández, 2014). As saponinas são substâncias que formam espuma estável em meio aquoso, são divididas no grupo que afeta o coração e no grupo que não afeta o coração. As saponinas que afetam o coração são usadas em terapia cardíaca e as saponinas não ativas-cardíacas podem ser obtidas de vegetais alimentícios como o inhame mexicano (Britannica, 2017). No entanto, quando se trata de um composto reativo de origem natural, a ação pode sofrer influência de outros fatores do meio reacional, como a composição química, a complexidade e propriedades físicas do alimento ou mesmo com relação a estrutura e composição química dos microrganismos (Juneja *et al.*, 2012).

Os ácidos ursólico e oleanólico, extraídos da nêspera, apresentaram relevante ação antimicrobiana frente às bactérias gram-positivas e gram-negativas (Palombo e Semple, 2001; Roula *et al.*, 2010; Abdou *et al.*, 2011; Bobis *et al.*, 2015).

Neste contexto, a nêspera contribui ao desenvolvimento de novos estudos por seus compostos bioativos em destaque; visto que os ácidos ursólico e oleanólico estão presentes no fruto, que é a porção comestível da planta, e têm associação à propriedade antimicrobiana (Perez G *et al.*, 1998; Li, 2011; Sultana, 2011; Xu e Chen, 2011; Wu *et al.*, 2013; Rashed e Butnariu, 2014). Estes ácidos são isômeros, de fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$, geralmente extraídos de plantas pelos solventes metanol, etanol ou água (Kim *et al.*, 2005; Koba *et al.*, 2007; Rashed e Butnariu, 2014; Delfanian, Esmaeilzadeh Kenari, *et al.*, 2015; Delfanian, Kenari, *et al.*, 2015). 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, hidroxibenzóico, cafeico, ferúlico, elágico e o o-cumárico (Kim *et al.*, 2011; Hong-Xia *et al.*, 2014; Yilong, 2016), estes compostos conjuntamente podem equilibrar ou intensificar a característica antimicrobiana deste fruto.

Para verificação da atuação destes compostos em alimentos é proposto o recobrimento de frutas pelo recobrimento do extrato da Nêspera. A laranja (*Citrus sinensis* Osbeck) foi a escolha dentre as frutas, pois o Brasil é líder mundial na produção de laranja e segundo o *United States Department of Agriculture – USDA*, a estimativa para a produção na safra mundial de laranja 2016/17 é de 49,610 mil toneladas sendo 18,197 mil toneladas respectivo à produção brasileira (Okino-Delgado e Fleuri, 2014; Abastecimento, 2017; Conab, 2017).

Material e métodos

Material

As nêspersas foram colhidas no campus da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e as laranjas foram adquiridas no comércio local da cidade de Belo Horizonte – MG.

Extração dos compostos bioativos da nêspera

Após colheita, a nêspera foi lavada em água corrente para retirada de sujidades grosseiras e em seguida a polpa foi separada das sementes e cada semente foi partida em dois pedaços. As porções foram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizadas e trituradas. As amostras trituradas foram diluídas a uma proporção de 20 gramas de amostra a cada 100 mL de solvente, sendo que o solvente, corresponde a mistura etanol-água em concentração 1:1 v/v. A solução permaneceu sob agitação, protegida da luz e em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) durante 48 horas. Os extratos foram separados dos resíduos amostrais por filtração em papel filtro e os solventes foram evaporados por meio de rotaevaporador à temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 70 mmHg em banho térmico B-491, rotaevaporador R-215 e bomba a vácuo V-700 da BUCHI. Os extratos foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises (Okonogi *et al.*, 2007; Tachakittirungrod *et al.*, 2007; Pérez-Gregorio *et al.*, 2011; Delfanian, Esmailzadeh Kenari, *et al.*, 2015).

Tratamento das laranjas

Esta análise foi realizada com objetivo de verificar a ação dos bioativos da nêspera quando aplicado na superfície externa do fruto e a consecutiva conservação destes frutos quando comparado a vida útil do fruto natural (sem adição de extrato na superfície). As laranjas foram divididas em três lotes onde o LOTE 1010 = laranjas controle (sem adição de extrato na superfície); LOTE 1030 = laranjas imersas em extrato de nêspera a 2,5 %; LOTE 1060 = laranjas imersas em extrato de nêspera a 5 %. Cada lote foi constituído por seis laranjas.

A organização analítica foi estruturada em três etapas com intervalo entre elas de 15 dias. Em cada uma das três etapas foram realizadas análises de cor, deformação e massa.

Compostos bioativos

Os compostos bioativos foram observados por Cromatografia Líquida de Alta performance - UPLC conforme parâmetros descritos por (Hong-Xia *et al.*, 2014), onde 5 mL do extrato foi filtrado através de um filtro de membrana de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ e acondicionado em um vial. Para a verificação dos picos entre 200 e 400 nanômetros foi utilizado um detector UV-vis de matriz de fotodiodo. Foi utilizada uma coluna C18 com a temperatura de funcionamento em $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. A fase móvel foi constituída da fase A, ácido acético / água (5 : 95, v / v) e pela fase B ácido acético / acetonitrilo / água (5 : 80 : 15, v / v). Em análise, o gradiente do solvente foi programado de 0 a 50 % de B em A durante 50 min a um caudal de 1,0 mL / min.

Cor

A análise de verificação da cor das laranjas foi realizada por Espectrofotômetro para medição de cor da marca Konica Minolta e modelo CM-2500c, com a determinação no sistema CIE L^*a^*b (Takatsui, 2011).

Massa

O Massa das laranjas foi determinado por aferição direta em balança analítica.

Deformação

A deformação das laranjas foi determinada em texturômetro de bancada, TA-XT2i Texture Analysers da Stable Micro Systems.

Análise estatística

Os dados serão tratados em Excel por ANOVA e, caso necessário, será utilizado o teste de Tukey, ambos com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Com relação a organização analítica, as três etapas analisadas foram respectivas as unidades amostrais de laranja, estes frutos estão apresentados na Figura 1 por organização dos Lotes em ordem cronológica. Alguns frutos foram descartados durante o experimento por motivo de deterioração anômala ao grupo. Estes frutos foram os correspondentes as posições Lote1010_3 no tempo 3 e Lote1060_3 no tempo 2.

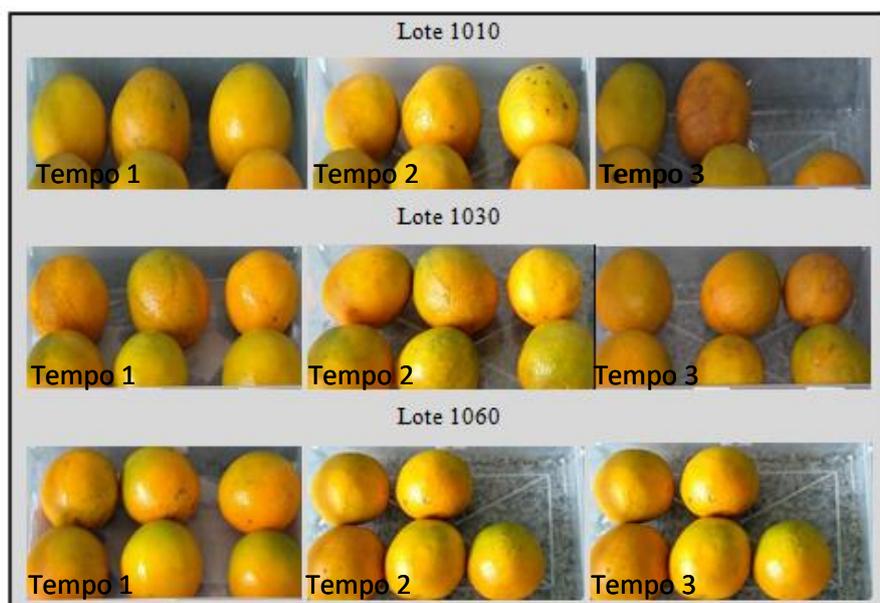


Figura 1: Organização analítica dos três Lotes e Tempos

Compostos Bioativos

Para a identificação da presença de compostos antimicrobianos no extrato da nêspera foi comparado concentrações diferentes de extrato, 10, 25 e 50 %, ao padrão analítico de ácido Ursólico, em grau de pureza maior que 98 %, condizendo assim às exigências da técnica. A figura 2 apresenta as concentrações analíticas em picos de ácido ursólico.

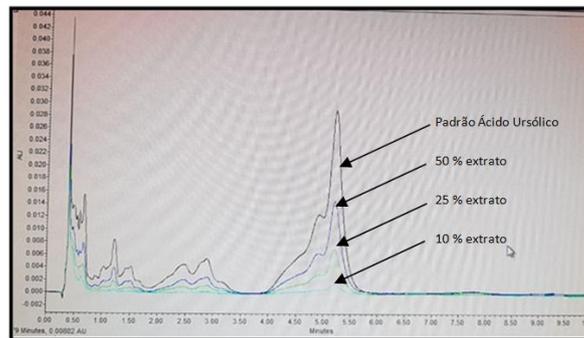


Figura 2: Gráfico Cromatográfico

Com o resultado desta análise é possível verificar a presença de ácido ursólico nos extratos evidenciando assim a possibilidade de ação antimicrobiana desta solução.

Aplicando o extrato na superfície dos frutos foi possível verificar que a cor e massa dos frutos variaram visualmente e a sua deformação tendia a aumentar. Após mensurar os dados de cor e massa foi realizada a técnica de deformação por texturômetro.

Cor

A cor foi classificada de acordo com a sua tonalidade (Munsell Hue), Luminosidade (Munsell Value) e saturação (Munsell Chroma). Pelo cálculo de Hue quanto mais próximo de 90° a amostra estiver, mais próximo a cor amarela é a cor da laranja, conforme apresentado na Figura 3.

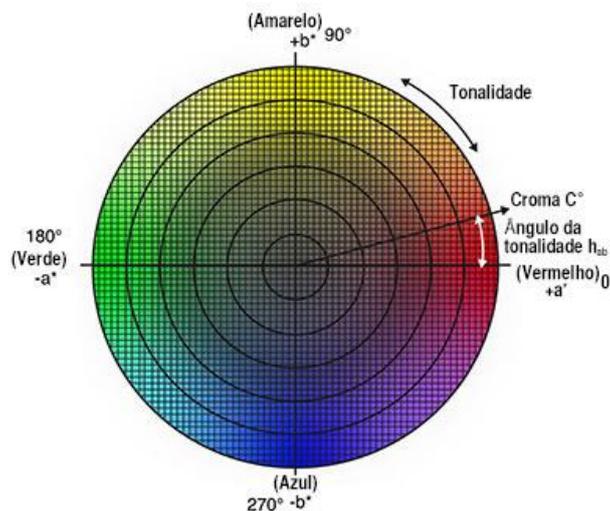


Figura 3: Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h

Fonte: konicaminolta (Minolta, 2017)

Não houve efeito estatístico significativo da adição de extrato de nêspera, nas concentrações 2,5 e 5%, em nenhum dos parâmetros colorimétricos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados dos parâmetros colorimétricos dos lotes contendo 0, 2,5 e 5% de extrato de nêspera, com 95% de significância.

Amostras	Parâmetro colorimétrico				
	L	a	b	h	C
Lote 1010	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Lote 1030	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Lote 1060	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Massa

A adição de extrato de nêspera, nas concentrações de 2,5 e 5%, Não apresentou diferença estatística no massa das amostras (Tabela 2). Por outro lado, houve redução significativa da perda de massa ao longo do tempo, o que era esperado devido à perda de água por transpiração.

Tabela 2 – Variação da massa das amostras ao longo do tempo.

Amostras	massa (g)			
	26/out	08/nov	23/nov	Médias ¹
Lote 1010	149,36	135,51	118,13	134,33 ^a
Lote 1030	147,11	133,69	122,21	134,33 ^a
Lote 1060	148,27	133,35	123,31	134,97 ^a
Média²	148,24 ^x	134,18 ^y	121,21 ^z	-

¹Médias seguidas por diferentes letras minúsculas (a-c) na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

²Médias seguidas por diferentes letras minúsculas (x-z) na mesma linha diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Deformação

A deformação dos frutos foi analisada mediante as condições de 6 mm de distância da sonda até o fruto, 0,98 N de força aplicada por um tempo de 5 segundos, ademais este teste foi programado para percorrer uma distância de ruptura igual a 1 mm caso a casca do fruto se rompesse. No entanto a força de 0,98 Newtons foi suficiente para analisar a força elástica na deformação e nenhuma das cascas rompeu e todas deformaram, confirmando assim o cálculo para deformação elástica. Desta forma obedecendo a lei de Hook possível analisar a deformação da superfície da laranja com as formulas 1, 2 e 3.

$$\sigma = P/A; \varepsilon = \Delta L/L; \sigma = E \times \varepsilon$$

$$\Delta L = \delta = (P \times L) / (E \times A)$$

$$\delta = (P \times a) / (E \times A), \text{ Lei de Hook para encurtamento}$$

Onde:

P = força aplicada

a = distância percorrida pela sonda

E x A = rigidez axial

Após realização dos cálculos da lei de Hook e análise de variância constatou que não há diferença entre as amostras do lote 1010, 1030 e 1060, pois o F crítico foi de 3,18 e o F foi inferior, apresentando valor de 1,88. Desta forma esta técnica analítica não apresentou diferença física dentre os lotes na conservação do fruto.

Conclusão

Este trabalho visualiza a possibilidade de recobrimento com característica antimicrobiana do extrato da Nêspera, pois o fruto não diferenciou perante os lotes com recobrimento bioativos, mas a concentração utilizada deve ser estabelecida por técnicas analíticas microbiológicas.

Referências

ABASTECIMENTO, C.-C. N. D. **Conjuntura Laranja**. ABASTECIMENTO, M. D. A. P. E.http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_03_22_15_46_01_conjuntura_laranja_fevereiro_2017.pdf 2017.

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.

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.

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.

BRITANNICA, E. **saponin**. *Encyclopædia Britannica*. LEARNING, B. D. 2017.

CONAB. **Conjuntura Laranja**. ABASTECIMENTO, C. N. D. A.-M. D. A. P. E.
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_03_22_15_46_01_conjuntura_laranja_fevereiro_2017.pdf 2017.

DELFANIAN, 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.; SAHARI, 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.

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.

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.

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.

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

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.

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

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.

OKONOJI, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.