

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului
“Regele Mihai I al României” din Timișoara



Facultatea de Inginerie Alimentară

SICOE Gabriela Andriana

TEZĂ DE DOCTORAT

*Cercetări privind obținerea unor suplimente alimentare cu
compuși bioactivi din fructe*

Conducător Științific

Prof. Univ. Dr. Ing. Adrian RIVIȘ

T i m i ș o a r a

2019

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului
"Regele Mihai I al României" din Timișoara
Facultatea de Inginerie Alimentară

Ing. SICOE Gabriela Adriana

TEZEI DE DOCTORAT

**CERCETĂRI PRIVIND OBTINEREA UNOR SUPLEMENTE
ALIMENTARE CU COMPUȘI BIOACTIVI DIN FRUCTE**

- REZUMAT -

**Conducător științific:
Prof. Dr. Ing. Adrian**

CUPRINS

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII. RODIA ȘI ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ -----	b
1.1. INTRODUCERE-----	b
1.2. RODIA – ORIGINE, ISTORIC, CULTIVARE, TAXONOMIE, CARACTERIZARE ȘI CONSERVARE-----	b
1.3. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A RODIEI -----	c
1.3.1. Semințele-----	c
1.3.2. Scoarța și rădăcina -----	c
1.3.3. Frunzele -----	c
1.3.4. Florile-----	c
1.3.5. Fructele – pericarp și mezocarp -----	c
1.3.6. Fructele – pulpa și sucul-----	c
1.4. ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI UTILIZĂRILE RODIEI -----	c
1.4.1. Activitatea antioxidantă – generalități-----	c
1.4.2. Activitatea antioxidantă a rodiei -----	c
1.4.3. Activitatea biologică a compușilor din rodie -----	c
1.4.4. Domenii de utilizare a rodiei-----	d
II. CERCETĂRI PROPRI. ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI UTILIZAREA EXTRACTELOR DE RODIE PENTRU OBTINEREA DE ALIMENTE FORTIFICATE -----	d
2.1. INTRODUCERE, SCOP ȘI OBIECTIVE-----	d
2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII-----	e
2.2.1. Activitatea antioxidantă a extractelor de rodie -----	e
2.2.2. Cinetica reacției DPPH· în prezența extractelor de rodie -----	f
2.2.3. Obținerea, caracterizarea și activitatea antioxidantă a produselor de patiserie -----	f
2.2.4. Cinetica reacției DPPH· în prezența extractelor din produsele de patiserie-----	g
2.2.5. Umiditatea și cinetica de uscare prin metoda lampii cu halogen pentru produsele alimentare de patiserie (biscuiți)-----	g
2.2.6. Analiza senzorială și analiza statistică multivariată a produselor de patiserie-----	h
III. CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI -----	j
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ -----	k

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII, RODIA ȘI ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ

I.1. INTRODUCERE

Alimentele reprezintă cei mai importanți factori care influențează viața omului, atât din punct de vedere existențial, cât și al sănătății. Este binecunoscut faptul că multe afecțiuni ale organismului sunt determinate în special de consumul diverselor alimente sau a produselor alimentare ce conțin diverse ingrediente. Influența componentelor alimentare asupra organismului uman este strâns legată și de alți factori cum sunt stilul de viață (fumatul, stresul, oboseala etc.), condițiile de trai și mediul înconjurător (1).

În ultimul timp se apelează din ce în ce mai des la consumul de alimente “bio” sau la procese și tehnologii ce presupun metode “verzi” sau “prietenoase cu mediul” (“green chemistry” sau “environmental friendly”). În plus, se încearcă găsirea unor remedii naturiste (acolo unde este posibil) pentru prevenirea, atenuarea sau tratarea unor afecțiuni. Între acestea, alimentele funcționale și suplimentele alimentare au cunoscut o dezvoltare puternică în ultimii ani. Există multe astfel de produse pe piață, care conțin diverse ingrediente naturale cu acțiune biologică mai mult sau mai puțin generală (suplimente alimentare) sau cu activitate biologică țintită (alimente funcționale cu destinație specifică – de exemplu alimente destinate diabeticilor sau pacienților cu diverse alte afecțiuni) (1).

Antioxidanții sunt compuși chimici utilizați în produse alimentare pentru efectul lor antioxidant, ce presupune prelungirea duratei de păstrare a alimentelor prin protejarea față de degradarea determinată de oxidare. Grăsimile, uleiurile comestibile și produsele alimentare care conțin astfel de ingrediente suferă procese de auto-oxidare (râncezire), ceea ce conduce la modificarea proprietăților senzoriale (gust și miros), reducerea valorii nutritive (degradarea acizilor grași esențiali), respectiv formarea unor compuși cu caracter toxic pentru organismul uman (de exemplu, radicali liberi) (1).

În acest studiu s-a realizat evaluarea activității antioxidante a unor extracte din diverse părți de rodie (*Punica granatum* L.), realizate cu utilizarea unor solvenți “environmental friendly”, precum și aplicarea acestor extracte naturale la obținerea unor produse alimentare de patiserie, cu proprietăți senzoriale și funcționale îmbunătățite.

I.2. RODIA – ORIGINE, ISTORIC, CULTIVARE, TAXONOMIE, CARACTERIZARE ȘI CONSERVARE

Rodia (*Punica granatum*) își are originea denumirii din *Pomum* (măr) și *granatus* (cu semințe); se mai numește măr cu semințe (2, 3). Cultivarea acestuia s-a extins din Asia Centrală (Iran) până în aproape toate zonele de pe Glob. Se cultivă diverse varietăți, atât în scopuri alimentare, cât și ornamentale. Este un arbore care crește până la 10 m înălțime, ale cărui fructe se consumă în perioada septembrie-februarie sau martie-mai pentru cele două emisfere. S-a considerat a fi unul dintre primii pomi fructiferi cultivați încă din anii 4000-3000 î.Ch., fiind menționat în Biblie și Coran (2). Cultivarea rodiei își are originile în era Neolitică din regiunea Transcaucaziană-Caspică și din nordul Turciei. Cei mai mari producători de rodie rămân totuși țările Mediteraneene. Există la ora actuală peste 500 de varietăți de rodie, dintre care aproximativ 50 de varietăți sunt cultivate pentru scopuri comerciale (2). Cele mai mari suprafețe cultivate cu rodie se găsesc în India, în timp ce Iranul este cel mai mare exportator. Se estimează că producția mondială anuală de rodie depășește 1,5 milioane de tone (2, 4).

I.3. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A RODIEI

Rodia este foarte bogată în nutrienți și compuși bioactivi, dintre care compușii antioxidanți sunt cei mai importanți. Aceștia se găsesc în special în fructe și sucul acestora, însă există compuși cu activitate antioxidantă și în scoarță, frunze și coaja fructelor de rodie. Principalele clase de compuși identificați în diversele părți ale arborelui de rodie sunt zaharurile simple, acizii organici alifatici și acizii grași, acizii fenolici și enolici, acizii hidroxibenzoici, acizii hidroxicinamici și compușii fenilpropanoidici, flavonoidele și flavonoid glicozidele, antocianidinele și antocianinele, taninurile, aminoacizii, indolaminele, alcaloizii, sterolii, triterpenoidele, glicolipidele și glicozidele fenil-alifatic (4-9).

I.3.1. Semințele. Uleiul din semințe de rodie reprezintă aproximativ 12-20% din masa totală, iar 80% din acest ulei este datorat prezenței acizilor octadecatrienoici. Dintre aceștia, cei mai importanți sunt acizii (9Z, 11E, 13Z)-punicic și linoleic, peste 95% fiind sub formă de trigliceride.

I.3.2. Scoarța și rădăcina. Scoarța și rădăcina de rodie este foarte bogată în diverși alcaloizi cu activitate biologică dovedită de-a lungul timpului (de exemplu, împotriva viermilor intestinali). Principalii alcaloizi identificați în scoarța și rădăcina de rodie fac parte din clasele alcaloizilor pelletierinici, piperidinici și pirolidinici (10).

I.3.3. Frunzele. Activitate antioxidantă importantă prezintă flavonoidele și flavonoid glicozidele din frunzele de rodie, cum este cazul apigeninei, apigenin-4'-O-glucopiranozidei sau a 3'- și 4'-O-glucopiranozidei luteolinului, respectiv 3'-O- β -xilopiranozidei acestuia, cu proprietăți progestinice și anxiolitice.

I.3.4. Florile. Florile de rodie conțin în special derivați de acid galic (care se găsesc și în pericarp) dar și triterpenoide cum sunt acizii ursolic, oleanolic, măslinic și asiatic (11).

I.3.5. Fructele – pericarp și mezocarp. Cele mai valoroase părți ale rodiei, din punct de vedere al activității antioxidante, sunt fructele, atât partea de coajă (pericarp și mezocarp – albedo), dar și pulpa și sucul de rodie, care se găsește în special în jurul semințelor. Pericarpul și mezocarpul rodiei conține cantități importante de flavonoide și flavonoid glicozide cum sunt kaempferolul și luteolinul, respectiv glicozidele și rhamnoglicozidele corespunzătoare, dar și rhamnoglucozida naringeninului, naringinul. Pe de altă parte, antocianidinele sunt, de asemenea, importante pentru activitatea antioxidantă a cojii de rodie, fiind identificate cianidina, pelargonidina și delphinidina (7, 12).

I.3.6. Fructele – pulpa și sucul. Cea mai mare varietate de compuși bioactivi se găsește în pulpa și sucul de rodie. Aceștia fac parte din clasa mono- și dizaharidelor, aminoacizilor, acizilor organici alifatici, acizilor enolici, hidroxibenzoici, hidroxicinamici, ciclitolilor carboxilici, flavonoidelor și glicozidelor acestora, antocianidinelor și, în special a antocianinelor derivate. Dintre zaharurile identificate, principalele mono- și dizaharide au fost glucoza, fructoza și zaharoza, iar dintre aminoacizi prolina, valina, metionina, triptofanul, serotonina, dar și derivatul triptofanului, melatonina. Acizii organici alifatici din pulpa de rodie fac parte din ciclul Krebs și sunt acizii citric, malic, tartric, fumaric și succinic. Acizii cu efect antioxidant identificați în sucul de rodie sunt în special acidul ascorbic (vitamina C), acizii galic, *p*-coumaric, cafeic și clorogenic (acesta din urmă rezultat la esterificarea acidului cafeic cu acidul quinic) (5, 13, 14). Cei mai importanți compuși bioactivi din pulpa și sucul de rodie, din punct de vedere al efectului antioxidant, sunt flavonoizii și flavonoid glicozizii, precum și antocianinele (4, 15, 16).

I.4. ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI UTILIZĂRILE RODIEI

I.4.1. Activitatea antioxidantă – generalități. Antioxidanții sunt compuși chimici unitari sau în amestec, care prelungesc durata de pătrare a produselor alimentare, protejându-le față de deteriorarea cauzată de oxidare (17, 18). Se pot reduce sau împiedica aceste procese de degradare oxidativă a uleiurilor și grăsimilor sau a produselor alimentare ce le conțin prin îmbunătățirea condițiilor de prelucrare, procesare, depozitare (scăderea temperaturii, absența luminii, ambalarea sub vid sau în atmosferă de gaz inert), respectiv adăugarea de compuși chimici cu caracter antioxidant (antioxidanți alimentari) (1, 17).

I.4.2. Activitatea antioxidantă a rodiei. Activitatea antioxidantă a rodiei este dată de diverșii compuși chimici, în special a celor care prezintă grupări fenolice în structură. Este în special cazul compușilor bioactivi din sucul și coaja fructului de rodie, cum sunt flavonoidele și flavonoid glicozidele, antocianidinele și derivații ce posedă resturi zaharidice, antocianinele, dar și acidul ascorbic și tocoferolii, derivații de acid galic și taninurile corespunzătoare, derivații de acid *p*-coumaric și cafeic (de exemplu, acidul clorogenic) (5, 16, 19).

I.4.3. Activitatea biologică a compușilor din rodie. Activitatea antioxidantă furnizată de compușii specifici din rodie este strâns legată de activitățile biologice ale acesteia. Tocoferolii (vitaminele E) sunt vitamine liposolubile care s-au identificat în rodie, în special în părțile hidrofobe (ulei din semințe de rodie). Se cunoaște faptul că acestea inhibă sinteza sfinbolipidelor (implicate în transmiterea impulsurilor nervoase și recunoașterea celulară), a activității COX-2 (ciclooxigenază, enzimă responsabilă de formarea prostanoizilor, a cărei inhibare

conduce la atenuarea simptomelor cauzate de inflamații și durere), precum și apoptoza (moartea) celulelor canceroase, fără a fi afectate celulele normale. Acidul ursolic și sterolii din semințe determină apoptoza celulelor canceroase MCF-7 (cancerul mamar), a celulelor canceroase endometriale și a celor ce determină apariția melanomului, ca urmare a activării caspasei-3, respectiv inhibă citokinele pro-inflamatorii și intervine în reglarea raportului glutatation/glutation oxidat. Acidul punicic din uleiul de semințe de rodie prezintă efect de activare a *in vivo* a funcției celulelor B (implicate în imunitate), respectiv efect citotoxic pentru celulele leucemice prin intermediul peroxidării lipidice.

I.4.4. Domenii de utilizare a rodiei. Rodia a fost utilizată încă din cele mai vechi timpuri atât în scopuri culinare, cât și în medicina tradițională. Cea mai utilizată parte a rodiei este fructul, din care se separă sucul de rodie. În funcție de conținutul de ellagitanninuri, acesta poate avea atât gust dulce, cât și acrișor. Sucul de rodie a fost printre cele mai populare în Europa și Asia Mică, iar acesta s-a răspândit în toate regiunile de pe Glob. De asemenea, se comercializează siropul de rodie, cunoscut ca “grenadin”, mult utilizat pentru prepararea diverselor cocktail-uri. Din rodie se obține și melasa și oțetul, precum și diverse sosuri și dressing-uri pentru salate, supe sau ciorbe, respectiv mâncăruri, iaurturi și înghețată pe bază de rodie. Fructele de rodie sunt utilizate și pentru obținerea unor lichioruri, singure sau în combinație cu alte fructe (7, 12).

Rodia a fost utilizată în medicina tradițională din Asia, unde a fost cultivată cu multe mii de ani în urmă în Persia și regiunile mediteraneene. Coaja de rodie prezintă cea mai mare concentrație de compuși cu activitate biologică, cum sunt flavonoidele și taninurile. Extractele din rodie prezintă proprietăți antibacteriene, în special împotriva unor microorganisme care determină infecții ale intestinului (de exemplu, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* sau *Vibrio cholerae*). Potențialul bioactiv al diverselor părți ale rodiei a fost utilizat în medicina tradițională pentru ameliorarea sau tratarea inflamațiilor, diareei, dizenteriei, ulcerului și hiperacidității gastrice, viermilor intestinali, tusei și chiar infertilității sau plăcii dentare (8, 9).

II. ACTIVITATEA ANTIOXIDANTĂ ȘI UTILIZAREA EXTRACTELOR DE RODIE PENTRU OBȚINEREA DE ALIMENTE FORTIFICATE

II.1. INTRODUCERE, SCOP ȘI OBIECTIVE

Fructul de rodie are un potențial antioxidant foarte mare prin prezența diversilor compuși fenolici. Toate părțile fructului de rodie (pulpă și suc, semințe și ulei de semințe, coaja exterioară și interioară – pericarp și mezocarp) conțin astfel de compuși antioxidanți, unele clase fiind întâlnite în toate aceste părți, altele fiind specifice doar unora dintre acestea. Principalele clase de compuși antioxidanți din rodie sunt flavonoidele și flavonoid glicozidele, antocianidinele și antocianinele, unele vitamine hidro- și liposolubile, derivații acizilor galic, ellagic, *p*-coumaric, cinamic și cafeic, precum și unele ellagitanninuri hidrolizabile. Acești compuși furnizează efecte biologice diverse, de la activități anti-inflamatorii, anti-helmintice, anti-colesterolemice până la cele anti-mutagene și anti-cancerigene.

Prin urmare, studiul experimental a avut ca obiectiv general evaluarea activității antioxidante a extractelor hidro-alcoolice din diverse părți ale rodiei, respectiv a activității antioxidante a unor produse alimentare de patiserie cu proprietăți fortifiante, obținute pe baza acestor extracte prin metode “environmental friendly”.

Principalele etape de studiu au presupus:

- Selecția și separarea părților principale din fructul de rodie
- Efectuarea extractelor hidro-alcoolice în diverse condiții menajante
- Evaluarea activității antioxidante a extractelor prin metode *in vitro*
- Obținerea produselor alimentare de patiserie pe bază de extracte de rodie
- Extracția compușilor antioxidanți din produsele de patiserie
- Evaluarea activității antioxidante a produselor de patiserie
- Corelarea datelor de activitate antioxidantă pentru materiile prime și produsul alimentar fortificat
- Evaluarea statistică a datelor și a posibilității utilizării produselor de patiserie pe bază de rodie ca alimente funcționale.

II.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII

II.2.1. Activitatea antioxidantă a extractelor de rodie. Sucul de rodie a fost separat din partea de pulpă cu un randament de $25.9 (\pm 5.3) \%$, raportat la fructul întreg, iar partea de coajă (pericarp și mezocarp – albedo) a reprezentat $60 (\pm 8.6) \%$ din întregul fruct. S-au analizat din punct de vedere al activității antioxidante atât părțile comestibile din fructul de rodie (cum ar fi pulpa și suncul de rodie, sau semințele), precum și părțile considerate ca deșeu (coaja exterioară și partea interioară a cojii, de culoare albă – albedo). Ambele surse pot furniza materii prime valoroase în obținerea de produse cu aplicații alimentare, farmaceutice sau cosmetice, prin prisma compușilor cu activitate antioxidantă care apar în aceste părți ale fructului de rodie.

Există mai multe metode de evaluare comparativă a activității antioxidante a unui compus chimic sau a unui amestec de componente cu diverse caracteristici, cum este cazul extractelor hidroalcoolice din diverse părți ale fructului de rodie. Majoritatea se bazează pe utilizarea unor compuși care reacționează cu compușii antioxidanți din amestecul de analizat. Este cazul radicalului liber stabil DPPH \cdot , care reprezintă abrevierea denumirii sistematice 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. Acesta reacționează cu radicalii liberi din sistemul de analizat (de exemplu, cei generați la scindarea homolitică a unor legături din compușii cu caracter antioxidant, în general fenolici), ceea ce face ca lungimea de undă la care acesta are absorbanta maximă (517 nm) să se deplaseze batocrom (la lungimi de undă mai mici) în urma interacțiunii cu radicalii liberi.

Procesul poate fi monitorizat spectrofotometric la 517 nm, iar dacă se utilizează o curbă de etalonare Absorbantă - Concentrație DPPH \cdot se poate monitoriza variația (sau consumul) concentrației de DPPH \cdot din amestecul ce conține compuși antioxidanți, dacă nu există interferențe majore cu alți compuși din sistem. Curba de etalonare a DPPH \cdot a fost determinată până la o concentrație a soluțiilor standard de 200 μM pe baza absorbanțelor maxime la 517 nm (Figura II.1).

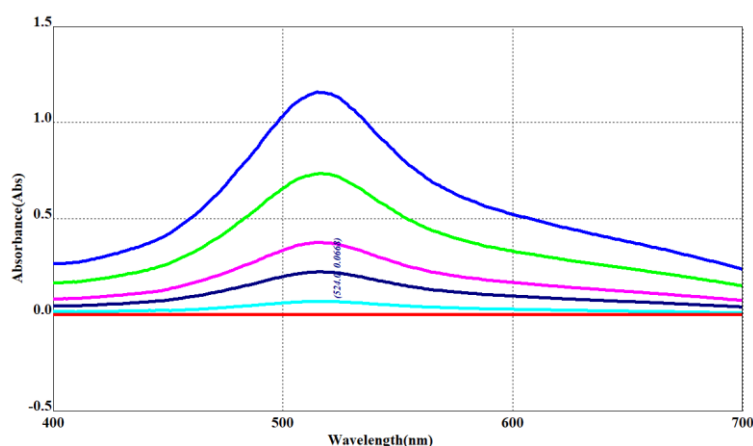


Figura II.1. Spectrele UV-Vis pentru soluția standard de DPPH \cdot (2,5 mL DPPH \cdot 1 mM și 0,5 mL etanol, albastru) și soluția martor (etanol, roșu)

Monitorizarea spectrofotometrică a absorbantei DPPH \cdot în prezența sucului sau extractelor din diverse părți ale fructului de rodie s-a realizat la un raport volumic soluție DPPH \cdot 1 mM:extract rodie:etanol de 1:1:4, la lungimea de undă la care absorbanta DPPH \cdot a fost maximă, 517 nm (în domeniul 515-521 nm, variația a fost nesemnificativă). În toate cazurile analizate, (“J” – suc de rodie, “RS” și “WS” – extracte din pericarp și mezocarp, “P” – extracte din pulpă, respectiv “S” – extracte din semințe măcinate de rodie), variația absorbantei în timp a fost invers logaritmă, chiar și la diluții de 1:50 și 1:100, efectuate cu etanol pentru ajustarea domeniului de analiză).

Valorile activităților antioxidante momentane, AO (%), au fost foarte diverse, atât la timpi scăziți de interacțiune (de exemplu, 90 secunde), cât și după 15 minute de monitorizare. Cele mai reprezentative valori din punct de vedere al diferențelor între activitățile antioxidante ale diverselor părți de fruct sunt cele de la 90 s, unde AO pentru sucul de rodie diluat 1:50 a fost de 13.7-18.4%, iar pentru cel diluat la 1:100 de 7.9-9.2%.

Pe de altă parte, extractele etanolice din coaja de rodie (atât pentru pericarp cât și pentru mezocarp, coduri “RS” și “WS”), ca de altfel și pentru cele obținute din pulpă (cod “P”), au fost cele mai active din punct de vedere al activității antioxidante. Valorile AO s-au situat în intervalul 46.9-54.9% pentru extractele din pericarp, mezocarp și pulpă la 90 s de monitorizare, respectiv de 48.4-65% la finalul monitorizării (15 minute).

II.2.2. Cinetica reacției DPPH· în prezența extractelor de rodie. Cinetica reacției DPPH· cu compușii cu activitate antioxidantă prezenți în sucul și extractele din diverse părți ale fructului de rodie (în special polifenoli din clasele flavonoidelor, antocianinelor și antocianidinelor, acizilor benzoici și cinamici, respectiv ellagitaninurilor hidrolizabile) poate fi evaluată prin intermediul vitezelor medii de reacție pe intervalele de timp în care variația concentrației DPPH· este aproximativ liniară (6, 20). Variația concentrației DPPH· se poate realiza cu ajutorul curbei de etalonare. Aceste variații, precum și dreptele de corelare liniară pe intervalele de timp considerate (<30 s, 30-90 s și 90-900 s), sunt prezentate exemplificativ în Figura II.2. Se observă o bună repetabilitate pentru analizele efectuate în duplicat sau triplicat, atât din punct de vedere al acurateții, cât și în ceea ce privește comportarea probelor în timpul reacției cu DPPH·.

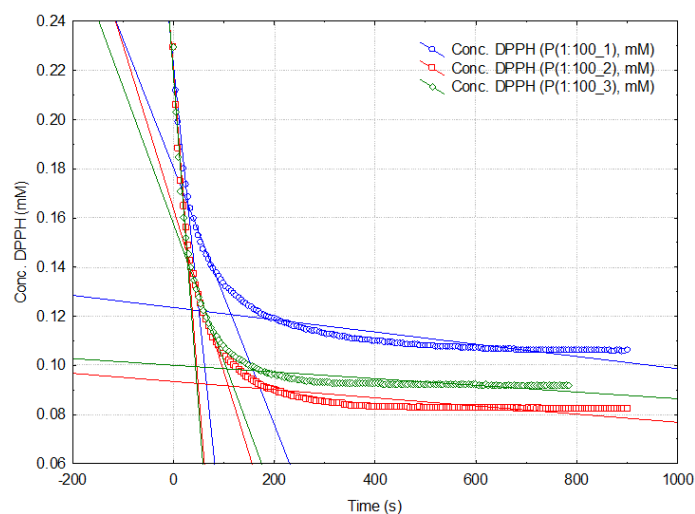


Figura II.2. Variația concentrației DPPH· în prezența extractului de pulpă de rodie (diluție 1:100 – analiză triplicat)

Vitezele medii de reacție ale DPPH· prezintă valori semnificativ mai mari pentru primul interval de timp studiat, în special în prezența extractelor din pericarp și mezocarp, respectiv din pulpă de rodie. Pentru cel de-al doilea interval aceste valori nu diferă semnificativ între sucul și extractele din coajă sau semințe de rodie. Se observă valori destul de bune și pentru al treilea interval de timp, ceea ce sugerează că efectul antioxidant se menține chiar și după 15 minute de activitate. Pentru extractele din pericarp, mezocarp și pulpă de rodie, vitezele de reacție DPPH· pentru primul interval de timp s-au situat în domeniul 2.4-3 $\mu\text{M/s}$, în timp ce pentru sucul de rodie și extractul din sămburi de rodie aceste valori au fost mult mai mici (0.33-0.85 $\mu\text{M/s}$ și, respectiv, 0.17-0.2 $\mu\text{M/s}$).

II.2.3. Obținerea, caracterizarea și activitatea antioxidantă a produselor de patiserie. În mod analog, s-a evaluat activitatea antioxidantă și cinetica de reacție DPPH· în prezența extractelor hidroalcoolice din produse de patiserie obținute pe bază de rodie, în comparație cu produsele martor, fără adaos de astfel de ingrediente cu efect antioxidant. S-au obținut diverse sortimente de biscuiți, pe bază de făină integrală de grâu, secară, ovăz, alac, cu semințe de mac, fulgi de ovăz, tărâțe de grâu, ulei de nuci de cocos, de in, concentrat din suc de struguri. Sortimentele s-au diferențiat prin adaos de adaos de Turmeric și Psyllium (cod “TuPsy” – Turmeric and Psyllium), Năut, Hrișcă și Orez (“CpBwRc” - Chickpeas, Buckwheat and Rice), Nuci și Busuioc (“WnBsl” - Walnuts and Basil), Lavandă și Mei (“LvMil” - Lavender and Millet), semințe de Căneapă și Chia (“HmChi” - Hemp seeds and Chia seeds), sau semințe de Dovleac și Negrilică (“PkBcw” – Pumpkin and Black caraway seeds). Acestea au fost utilizate ca atare, respectiv s-au obținut cu adaos suplimentar de suc de rodie proaspăt și făină din sămburi de rodie, la un raport masic inițial bază de biscuiți:suc de rodie:făină din semințe de rodie de 25:25:10 (adaosul de rodie a fost indicat codificat prin “Pg” – pomegranate: “PgTuPsy”, “PgCpBwRc”, “PgWnBsl”, “PgLvMil”, “PgHmChi” și, respectiv, “PgPkBcw”).

Variația absorbției DPPH· în prezența extractelor din produsele de patiserie pe bază de rodie sau a produselor martor este tot invers logaritmică, însă cu o viteză de variație mult mai mare în primul interval de timp, urmată de o scădere puțin accentuată cu o tendință de aplatizare după aproximativ 30 secunde. Acest lucru este mult mai evident pentru probele cu rodie în comparație cu cele martor.

Ca urmare a acestei comportări, activitatea antioxidantă momentană, AO (%), are valori destul de apropiate pe domeniul 15-900 s, chiar dacă acestea sunt semnificative ca valoare absolută. Oricum, valorile AO sunt semnificativ mai mari pentru probele cu adaos de rodie, în comparație cu probele martor, care nu conțin extracte de rodie. Dacă se compară valorile activităților antioxidante momentane la diferiți timpi ai analizei, de exemplu la un timp foarte apropiat de momentul de start al interacțiunii (o valoare potrivită pentru acest lucru este la 15 s), la un moment intermediar (90 s) și la finalul evaluării (15 minute) se observă că valorile AO sunt în domeniile 33-48% pentru toate cele trei momente ale analizei, în cazul produselor de patiserie cu adaos de rodie, în comparație cu 21.9-32.9%, 23.3-33.5% și, respectiv, 24.7-35.2% pentru probele martor, fără adaos suplimentar de suc și făină din sâmburi de rodie.

Cele mai mari valori ale AO s-au obținut pentru extractele din probele de biscuiți cu Năut, Hrișcă și Orez, cu Turmeric și Psyllium, respectiv cu Dovleac și Negrilică, în ambele variante cu și fără adaos de rodie. Pe de altă parte, probele cu Lavandă și Mei, respectiv cu semințe de Căneapă și Chia, care conțin cantități mult mai mici de compuși antioxidanți, au prezentat valorile cele mai mici ale activității antioxidante.

II.2.4. Cinetica reacției DPPH· în prezența extractelor din produsele de patiserie. Activitatea antioxidantă corelează foarte bine cu vitezele de reacție DPPH· în prezența extractelor obținute din produsele de patiserie. Astfel, corelarea porțiunilor pseudoliniare ale variației concentrației DPPH· în timp a permis determinarea vitezelor medii de reacție pentru aceste intervale: 0-30 s, 30-90 s și 90-900 s. Viteza de reacție a fost semnificativ mai mare pe primul interval, situându-se în domeniul 1.8-2.55 $\mu\text{M/s}$ pentru probele cu adaos suplimentar de suc și făină din sâmburi de rodie și de doar 1.25-1.8 $\mu\text{M/s}$ pentru probele martor corespunzătoare. Vitezele de reacție pentru celelalte intervale au fost mult mai mici și mai puțin relevante, deși pentru probele martor acestea au avut valori mai mari în comparație cu probele cu adaos de rodie.

II.2.5. Umiditatea și cinetica de uscare prin metoda lampii cu halogen pentru produse alimentare de patiserie (biscuiți). Conținutul de apă sau umiditatea unui produs alimentar, în special al celor pe bază de produse cerealiere, este un indicator important al calității unor astfel de produse (21-32). Dacă activitatea apei (raportul dintre presiunea vaporilor de apă de deasupra produsului alimentar și presiunea vaporilor de apă la saturație, în condiții specifice) este prea mică sau în special prea mare, este favorizată dezvoltarea microorganismelor. Astfel, la o activitate a apei peste 0.91 este favorizată dezvoltarea bacteriilor, iar fungiile se dezvoltă la o activitate a apei de peste 0.7.

Cinetica uscării unui produs alimentar poate da informații indirecte privind modul de reținere a moleculelor de apă în matricea alimentară, care este corelată cu activitatea apei. Pentru determinarea conținutului de umiditate (în principal apă) din produsele de patiserie analizate s-a apelat la metoda directă de uscare la termobalanță cu ajutorul lampii cu halogen. Aceasta permite monitorizarea continuă a masei de probă, respectiv a umidității momentane, precum și a temperaturii de uscare. Pentru probele pe bază de făină din cereale, care rețin moleculele de apă destul de puternic, este necesară setarea unei temperaturi de uscare mai mare. S-a menținut o valoare a temperaturii de uscare de 120 °C pe tot parcursul procesului de uscare, iar finalizarea uscării s-a stabilit la menținerea constantă a masei de probă timp de cel puțin 90 secunde la această temperatură.

Probele de biscuiți cu semințe de Căneapă și Chia, respectiv cu semințe de Dovleac și Negrilică necesită timpi de uscare foarte mici (860-960 s și, respectiv, 540-780 s), în comparație cu probele pe bază de făină de Năut, Hrișcă și Orez, unde timpii de uscare au fost mult mai mari (1470-3120 s). Totuși, diferențele privind conținutul de umiditate final nu sunt prea mari, acestea situându-se între 6.33 (± 0.10) % pentru probele de biscuiți cu Nuci și Busuioc, respectiv semințe de Căneapă și Chia, și 7.96 (± 0.45) % pentru probele cu Turmeric și Psyllium. Acuratețea determinărilor este destul de bună, deviațiile standard pentru determinările triplicat fiind în intervalul (0.1-0.92) % (Figura II.3, Tabel II.1).

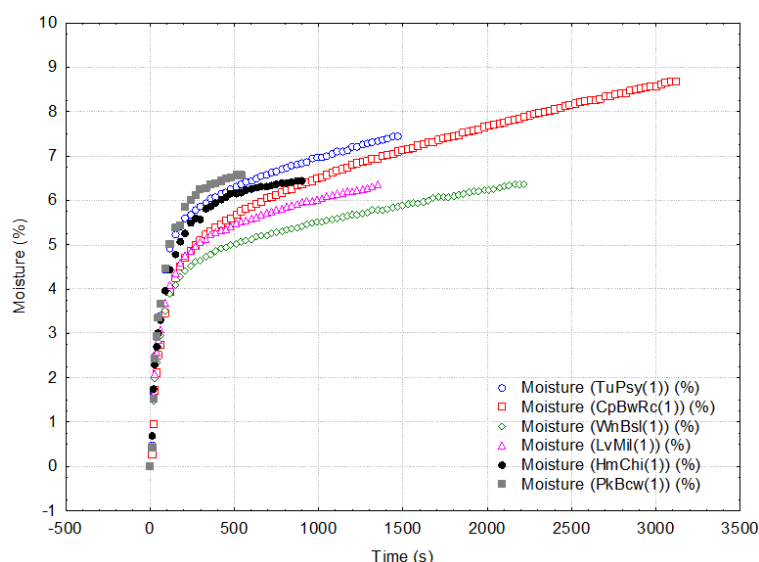


Figura II.3. Variația umidității (%) produselor de patiserie în timpul procesului de uscare cu lampa cu halogen

Tabel II.1. Umiditatea finală determinată prin metoda uscării la lampa cu halogen pentru probele de produse alimentare de patiserie

Nr.	Probă (\pm Deviația Standard)	Umiditate finală (%)
1	TuPsy \pm SD	7.955 \pm 0.451
2	CpBwRc \pm SD	7.697 \pm 0.919
3	WnBsl \pm SD	6.330 \pm 0.098
4	LvMil \pm SD	6.815 \pm 0.603
5	HmChi \pm SD	6.321 \pm 0.099
6	PkBcw \pm SD	6.616 \pm 0.102

O imagine mult mai elocventă privind modalitatea de legare a moleculelor de apă în matricea alimentară rezultă din curbele cinetice ale procesului de uscare. Dacă se corelează variația procentului de umiditate momentană în timp pentru porțiunile pseudoliniare ale graficului se poate realiza o comparație cantitativă în ceea ce privește modul de reținere al moleculelor de apă în produsul alimentar, care se poate corela mai departe cu compoziția acestor produse.

Pantele dreptelor de corelare pe intervalele de timp de uscare 0-30 s, 30-400 s și >400 s, exprimate în variație procentuală de umiditate în unitatea de timp (%/s), reprezintă vitezele de uscare corespunzătoare, v_{1-3} . Aceste viteze sunt semnificativ mai mari în primele 30 s de uscare, unde este separată apa “de suprafață”, foarte slab legată în matricea alimentară, în comparație cu vitezele pe celelalte două intervale, unde se eliberează în special apa “puternic legată” în matricea alimentară. Vitezele de uscare pentru apa “de suprafață” sunt situate în domeniul 0.057-0.088 %/s, cu valori maxime pentru probele de biscuiți pe bază de semințe de Dovleac și Negrilică, urmate de cele pe bază de semințe de Căneapă și Chia. Pe de altă parte, cele mai mici valori sunt determinate pentru probele pe bază de făină de Năut, Hrișcă și Orez, respectiv Nuci și Busuioc. Pentru apa “puternic legată”, vitezele corespunzătoare de uscare pentru cel de-al doilea și al treilea interval sunt destul de apropiate, acestea fiind în domeniul 0.0075-0.0099 %/s și, respectiv 0.0008-0.0017 %/s.

2.2.6. Analiza senzorială și analiza statistică multivariată a produselor de patiserie. Analiza senzorială a presupus evaluarea unor caracteristici organoleptice ale produselor de patiserie de tip biscuiți cu adaos suplimentar de suc și făină din sămburi de rodie sau fără astfel de adaosuri, pentru evaluarea acceptabilității acestor produse alimentare îmbunătățite (care pot fi considerate produse alimentare fortificate, prin prezența compușilor antioxidanți din rodie), precum și a similarităților/disimilarităților acestor produse. În plus, se pot evalua parametrii și caracteristicile importante pentru acceptabilitate.

Produsele au fost evaluate organoleptic de un panel format din 12 subiecți din rândul consumatorilor de astfel de produse, S-au evaluat aspectul - parametru “*Appearance*” și aspectul în secțiune – “*Section*”, culoare – “*Color*”, consistența – “*Firmness*”, mirosul – “*Smell*” și gustul – “*Taste*”. Pentru cuantificarea acestor parametri s-a utilizat scara cu punctaj “5-1”, unde “5” reprezintă acceptabilitate maximă, iar “1” este atribuit neacceptabilității produsului din punct de vedere al parametrului evaluat.

Deoarece numărul datelor obținute în urma analizei senzoriale este foarte mare și dificil de evaluat, s-a apelat la prelucrarea statistică multivariată a acestor date (33-35). O tehnică eficientă pentru astfel de prelucrări statistice este analiza componentelor principale (PCA – Principal Component Analysis), care presupune gruparea probelor pe baza varianței datelor experimentale obținute pentru parametri considerați (36-38). Dacă probele evaluate sunt probele de biscuiți cu și fără adaos de rodie (6 probe cu rodie, 6 probe fără rodie, evaluate de către 12 subiecți), iar parametrii independenți sunt cei prezentați mai sus (aspect, secțiune, culoare, consistență, miros și gust), ceea ce reprezintă $144 \times 6 = 864$ valori numerice, prin tehnica PCA se caută în spațiul proprietăților acea direcție față de care varianța datelor este maximă.

Pentru cazul produselor pe bază de Turmeric și Psyllium, cu sau fără adaos de rodie (coduri “*PgTuPsy*” și, respectiv, “*TuPsy*”), gruparea acestora pe baza datelor de analiză senzorială nu a fost foarte evidentă, deși se observă o mai bună acceptabilitate pentru probele cu rodie în partea dreapta-sus a graficului scorurilor. Această clasificare se datorează în special gustului, aspectului și consistenței pentru partea pozitivă, respectiv culorii pentru partea negativă, așa cum rezultă din graficul încărcărilor. Varianța explicată a datelor este de doar 40% pentru primele două componente principale (PC_1 – 18% și PC_2 – 22%).

Prelucrarea statistică multivariată a datelor de analiză senzorială pentru probele de biscuiți cu Lavandă și Mei a indicat o grupare foarte bună a celor cu adaos de suc și făină din semințe de rodie în partea pozitivă a graficului scorurilor PC_2 vs. PC_1 (Figura II.4). Această clasificare a fost determinată în special de variabilele independente culoare și consistență pentru PC_1 , respectiv miros pentru PC_2 , conform graficului încărcărilor PC_2 vs. PC_1 . Varianța explicată a datelor este de 33% pentru prima componentă principală și de 24% pentru cea de-a doua.

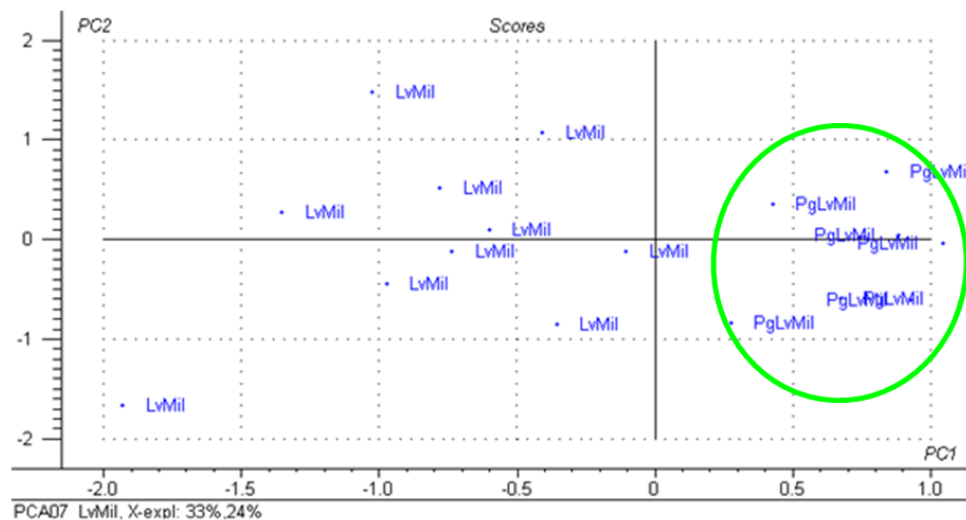


Figura II.4. Reprezentarea scorurilor PC_2 versus PC_1 din analiza PCA a datelor de analiză senzorială pentru probele de biscuiți cu Lavandă și Mei, cu adaos de suc și făină din semințe de rodie sau fără adaos de rodie, coduri “*PgLvMil*” și “*LvMil*”

III. CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

În urma studiilor privind activitatea antioxidantă a sucului și extractelor hidroalcoolice din diverse părți ale fructului de rodie (*Punica granatum* L.), respectiv a aplicabilității acestora în obținerea de produse alimentare fortificate, dar și a studiilor cinetice din procesul de evaluare a activității antioxidante, utilizând metoda captării radicalului liber DPPH· (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), respectiv a cineticii de uscare a produselor de patiserie propuse ca alimente funcționale și a analizei senzoriale a acestora se pot trasa următoarele concluzii:

- Cea mai mare activitate antioxidantă s-a obținut pentru extractele hidroalcoolice din pericarpul și mezocarpul fructului de rodie, efectul fiind pronunțat chiar și după un interval scurt de acțiune, de 90 secunde;
- Sucul de rodie a prezentat activitate antioxidantă mai scăzută, dar efectul este important chiar și după 15 minute de interacțiune, ceea ce sugerează activitate prelungită din punct de vedere al activității antioxidante;
- Studiul cinetic pentru modelul reacției radicalilor liberi standard cu compușii antioxidanți din suc și extractele hidroalcoolice din fructul de rodie (ce conțin diverși compuși polifenolici și enolici) au indicat faptul că extractele din părțile de fruct considerate ca deșeu (pericarp și mezocarp) sunt valoroase din punct de vedere al activității antioxidante, ceea ce sugerează recuperarea și utilizarea acestora pentru obținerea de produse ce necesită protecție antioxidantă în domenii cum este cel alimentar, farmaceutic sau cosmetic;
- În cazul produselor de patiserie cu adaos de suc și făină din sămburi de rodie, activitatea antioxidantă este semnificativă, fiind cu aproximativ 7.4-19.1% mai mare față de probele fără adaos de rodie;
- Cinetica de reacție din procesul de evaluare a activității antioxidante a relevat o interacțiune rapidă a compușilor cu activitate antioxidantă prezenți în produsele de patiserie în primele 15 s ale procesului, vitezele de reacție fiind cu ~50% mai mari pentru probele cu adaos de rodie, în comparație cu cele martor;
- Umiditatea produselor de patiserie s-a situat în intervalul 6.33-7.96%, cele mai mici valori fiind întâlnite la produsele cu conținut de ingrediente oleaginoase (semințe), iar cele mai mari valori la produsele cu adaos de plante condimentare;
- Cinetica procesului de uscare a permis evaluarea modului de legare a apei în matricea alimentară a produselor de panificație, cele cu conținut ridicat de ingrediente oleaginoase având un procent mai mare de apă “de suprafață”, iar cele cu adaos de făinuri amidonoase având în special apă “puternic legată” în matricea alimentară;
- Analiza senzorială a produselor de panificație cu adaos de suc și făină din semințe de rodie, în comparație cu cele fără adaos de rodie, a fost realizată pe baza a șase caracteristici organoleptice – aspect și secțiune, miros și gust, culoare și consistență; s-a observat o mai bună acceptabilitate pentru produsele cu rodie în special pentru cazurile celor cu Năut, Hrișcă și Orez, respectiv a produselor cu rodie, Nuci și Busuioc;
- Analiza statistică multivariată PCA a permis identificarea variabilelor care permit clasificarea în zona de acceptabilitate mare a produselor alimentare de patiserie fortificate prin adaos de suc și făină din semințe de rodie, acestea fiind în special miros și gust, consistență și aspect în secțiune;
- Potențarea acestor caracteristici organoleptice prin adăugare de suc și făină din semințe de rodie la produsele de patiserie studiate, în scopul obținerii de produse alimentare fortificate/funcționale este mai evidentă pentru produsele de patiserie ce conțin ingrediente cu uleiuri esențiale din plante aromatice și condimentare, cum este cazul produselor cu Lavandă sau a celor cu Busuioc.

Rezultatele valoroase obținute în urma studiilor legate de evaluarea activității antioxidante a extractelor din diverse părți ale fructului de rodie (*Punica granatum* L.), precum și cercetările ulterioare conduc la unele recomandări și anume:

- Identificarea unor surse alternative de materii prime care să poată fi supuse extracției compușilor bioactivi de tipul celor cu activitate antioxidantă, cum este cazul unor produse secundare sau deșeuri rezultate în diverse procese din industria alimentară (de exemplu, din industria sucurilor de fructe);
- Aplicarea unor astfel de produse din surse alternative de compuși bioactivi în obținerea de noi produse alimentare “cu activitate biologică” – alimente funcționale / alimente fortificate sau suplimente alimentare;
- Aplicarea unor astfel de produse din surse alternative în obținerea de noi produse cosmetice cu proprietăți valoroase (datorită prezenței compușilor bioactivi cu activitate antioxidantă, care pot fi extrași din astfel de surse / deșeuri);
- Aplicarea produselor separate din astfel de surse în obținerea de produse farmaceutice, care însă necesită studii și etape specifice aprobării pentru utilizare medicală;
- Abordarea de tehnici de separare “environmental friendly” și optimizarea acestor procese de separare pentru compuși bioactivi cu activitate antioxidantă din surse vegetale de tip deșeuri din industria alimentară, cu aplicabilitate în domeniile alimentar, cosmetic și chiar farmaceutic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. Food chemistry. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2009.
2. Teixeira-da-Silva JA, Rana TS, Narzary D, Verma N, Meshram DT, Ranade SA. Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*. 2013;160:85-107.
3. Opara UL, Atukuri J, Fawole OA. Application of physical and chemical postharvest treatments to enhance storage and shelf life of pomegranate fruit - A review. *Scientia Horticulturae*. 2015;197:41-9.
4. Karimi M, Sadeghi R, Kokini J. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology*. 2017;69:59-73.
5. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48:4581-9.
6. Sicoe G, Oprinescu CI, Golea GM, Riviș A, Hădăruță NG. Kinetics on the DPPH· reaction with hydroalcoholic extracts from various pomegranate parts. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 2017;23(4):271-80.
7. Akhtar S, Ismail T, Fraternali D, Sestili P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry*. 2015;174:417-25.
8. Ismail T, Sestili P, Akhtar S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;143:397-405.
9. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;109:177-206.
10. Orgil O, Schwartz E, Baruch L, Matityahu I, Mahajna J, Amir R. The antioxidative and anti-proliferative potential of non-edible organs of the pomegranate fruit and tree. *LWT - Food Science and Technology*. 2014;58:571-7.

11. Fu Q, Zhang L, Cheng N, Jia M, Zhang Y. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers. Food and Bioproducts Engineering. 2014;92:321-7.
12. Çam M, İcyer NC, Erdoğan F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. LWT - Food Science and Technology. 2014;55:117-23.
13. Hmid I, Elothmani D, Hanine H, Oukabli A, Mehinagic E. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. Arabian Journal of Chemistry. 2017;10:S2675-S84.
14. Kalaycıoğlu Z, Erim FB. Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide. Food Chemistry. 2017;221:496-507.
15. Masci A, Coccia A, Lendaro E, Mosca L, Paolicelli P, Cesa S. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. Food Chemistry. 2016;202:59-69.
16. Mphahlele RR, Fawole OA, L.M.Mokwena, Opara UL. Effect of extraction method on chemical, volatile composition and antioxidant properties of pomegranate juice. South African Journal of Botany. 2016;103:135-44.
17. Carochi M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology. 2013;51:15-25.
18. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Food Research International. 2015;74:10-36.
19. Ivanovici M, Sicoe G, Hădăruță DI. Kinetics and antiradical activity of natural and synthetic phenolic compounds by DPPH method: a comparative study. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies. 2018;24(2):97-103.
20. Zippenfening SE, Sicoe G, (Corpaș) LR, Dumitrelea RG, Nistor AG, David I, et al. Antioxidant activity and kinetics of extracts from some leaves used in Transylvanian traditional food products (*Tilia – Tilia tomentosa* Moench. and Patience Dock – *Rumex patientia* L.) by DPPH method. Bologna: Proceedings of the International Conference on Life Sciences, Filodiritto Publisher; 2018. 1134-41 p.
21. Isengard H-D. Rapid water determination in foodstuffs. Trends in Food Science & Technology. 1995;6:155-62.
22. Isengard H-D. Water determination - Scientific and economic dimensions. Food Chemistry. 2008;106:1393-8.
23. Corpaș L, Hădăruță NG, David I, Pîrșan P, Hădăruță DI, Isengard H-D. Karl Fischer water titration - Principal component analysis approach on wheat flour. Food Analytical Methods. 2014;7:1353-8.
24. Hădăruță DI, Birău-(Mitroi) CL, Gruia AT, Păunescu V, Bandur GN, Hădăruță NG. Moisture evaluation of β -cyclodextrin/fish oils complexes by thermal analyses: A data review on common barbel (*Barbus barbus* L.), Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennett), European wels catfish (*Silurus glanis* L.), and common bleak (*Alburnus alburnus* L.) living in Danube river. Food Chemistry. 2017;236:49-58.
25. Hădăruță DI, Costescu CI, Corpaș L, Hădăruță NG, Isengard H-D. Differentiation of rye and wheat flour as well as mixtures by using the kinetics of Karl Fischer water titration. Food Chemistry. 2016;195:49-55.

26. Hădărugă DI, Hădărugă NG, Bandur GN, Isengard H-D. Water content of flavonoid/cyclodextrin nanoparticles: Relationship with the structural descriptors of biologically active compounds. *Food Chemistry*. 2012;132:1651-9.
27. Hădărugă NG, Bandur GN, Hădărugă DI. Chapter 4. Thermal Analyses of Cyclodextrin Complexes. In: Fourmentin S, Crini G, Lichtfouse E, editors. *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis. Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Singapore: Springer International Publishing AG, Springer Nature; 2018. p. Online First.
28. Hădărugă NG, Hădărugă DI, Isengard H-D. Water content of natural cyclodextrins and their essential oil complexes: A comparative study between Karl Fischer titration and thermal methods. *Food Chemistry*. 2012;132:1741-8.
29. Hădărugă NG, Hădărugă DI, Isengard H-D. “Surface water” and “strong-bonded water” in cyclodextrins: a Karl Fischer titration approach. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2013;75:297-302.
30. Padivitage NLT, Smuts JP, Armstrong DW. Water determination. In: Riley CM, Rosanske TW, Riley SRR, editors. *Specification of drug substances and products development and validation of analytical methods*. Amsterdam: Elsevier Ltd.; 2014. p. 223-41.
31. Ünlüsayın M, Hădărugă NG, Rusu G, Gruia AT, Păunescu V, Hădărugă DI. Nano-encapsulation competitiveness of omega-3 fatty acids and correlations of thermal analysis and Karl Fischer water titration for European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) oil/ β -cyclodextrin complexes. *LWT - Food Science and Technology*. 2016;68:135-44.
32. Sicoe G, Zippenfening SE, Simandi MD, Szakal Ra, Gălan IM, David I, et al. Halogen-drying kinetics of some vegane crackers as fortified food products. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 2018;24(4):311-6.
33. Dijksterhuis G. *Multivariate Data Analysis in Sensory and Consumer Science: An Overview of Developments*. Trends Food Sci & Technol. 1995;6:206-11.
34. Esbensen K, Schonkopf S, Midtgaard T. *Multivariate Analysis in Practice*. I ed. Trondheim: CAMO Computer - Aided Modelling AS; 1996. 312 p.
35. Gordon AD. *Classification. Methods for the Exploratory Analysis of Multivariate Data*. London - New York: Chapman & Hall; 1981. 193 p.
36. Shaw PE, Moshonas MG, Buslig BS, Barros SM, Widmer WW. Discriminant and Principal Component Analyses to Classify Commercial Orange Juices Based on Relative Amounts of Volatile Juice Constituents. *J Sci Food Agric*. 1999;79:1949-53.
37. *. *Statistical Procedures in Food Research*. I ed. Piggott JR, editor. London - New York: ELSEVIER Applied Science; 1986. 415 p.
38. O'Mahony M. *Sensory Evaluation of Food. Statistical Methods and Procedures*. New York - Basel: Marcel Dekker, Inc.; 1986. 487 p.