UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

LIMA ÁCIDA (*Citrus latifolia*, Tanaka.) CV. TAHITI CULTIVADA EM LAVOURAS CONVENCIONAL E BIODINÂMICA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SUCO E OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

Carolina Netto Rangel

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LIMA ÁCIDA (*Citrus latifolia*, Tanaka.) CV. TAHITI CULTIVADA EM LAVOURAS CONVENCIONAL E BIODINÂMICA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DO SUCO E OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

CAROLINA NETTO RANGEL

Sob a Orientação da Professora
Djalva Maria da Nóbrega Santana
e Co-orientação da Professora
Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2008

664.804337
R196l
T

Rangel, Carolina Netto, 1982-
Lima ácida (Citrus latifolia, Tanaka) cv. Tahiti cultivada em lavouras convencional e biodinâmica : caracterização física e química do suco e otimização da hidrólise enzimática / Carolina Netto Rangel. – 2008.
62 f. : il.

Orientador: Djalva Maria da Nóbrega Santana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia.
Bibliografia: f. 54-62.

1. Lima ácida tahiti - Teses. 2. Lima ácida tahiti – Ánalise - Teses. 3. Suco de frutas – Teses. 4. Hidrólise enzimática – Teses. I. Santana, Djalva Maria da Nóbrega, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Tecnologia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CAROLINA NETTO RANGEL

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências,** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____

_____
Djalva Maria da Nóbrega Santana (D.Sc.) UFRRJ
(Orientadora)

_____
Lucia Maria Jaeger de Carvalho (D.Sc) UFRJ

_____
Marcos José de Oliveira Fonseca (D.Sc.) CTAA/Embrapa

_____
Sandra Regina Gregório (D.Sc) UFRRJ

_____
Antônio Gomes Soares (D.Sc) CTAA/Embrapa

_____
Cristiane Hess de Azevedo Meleiro (D.Sc) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Àquela que um dia me disse “passa aqui que tenho um projeto pra você.”
Que esteve sempre disposta a tomar partido, em meu favor.
Àquela que briga quando precisa brigar, reclama (mesmo que sem motivo) mas também tece seus elogios... lá do jeito dela...
Àquela que sempre fez o possível, o impossível e o improvável para que ele estivesse aqui hoje, escrito.
Lucia, esse trabalho é dedicado à você.

AGRADECIMENTOS

Fica aqui meu muito obrigado a todos os que estiveram comigo, ao longo de mais essa odisséia...

MÃE, PAI...obrigado por terem feito, sempre, tudo para que esse dia chegasse.

PAULA, valeu pela companhia e, claro, pela assistência técnica e as várias manutenções no PC.

MÔNICA, RENATINHA E THAÍS, pelas elucubrações filosóficas, práticas e ideológicas, respectivamente!

GUSTAVO, por todo o apoio, tempo e amor dedicados a mim; obrigado...

ANTÔNIO, que desde o início me auxiliou em tudo o que foi necessário.

DJALVA, que acolheu a nossa causa, quando tudo parecia perdido.

MARÍLIA E JOSÉ LUIZ, que me concederam uma bolsa que tem sido de grande valia.

ÉRIKA, pela companhia, tanto nas nossas viagens inacreditáveis, quanto nas infindáveis caronas até a Rural!

PATRÍCIA E RENATA, por terem compartilhado comigo suas histórias enquanto nos ajudávamos a continuar no caminho (durante aquelas mesmas infindáveis caronas, e muitas outras...)

LUCIA, que tornou a existência desse trabalho possível e ao CNPq, que nos concedeu o apoio financeiro necessário.

Todos os que estiveram envolvidos de alguma forma na execução desse projeto: EDGAR, HENRIQUETA, MANUELA, VANESSA...

E a MIM também, que tive que ter muita paciência comigo!

Enfim, a todos vocês minha gratidão e... até o doutorado...?!

O presente trabalho foi realizado na Embrapa Agroindústria de Alimentos, com financiamento concedido em 2005 e 2006 à Prof. Dr. Lucia Maria Jaeger de Carvalho pelo Edital Universal 2004, do CNPq (nº do processo: 472389/2004-1). Esta dissertação é parte integrante deste projeto, intitulado “Caracterização de sucos de limão (*Citrus limon*, L.), cv. Tahiti, por Plantio Convencional e Biodinâmico e Clarificação por Microfiltração”, que se encontra em andamento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações redox e transporte de ascorbato (AsA). 14

Figura 2. Vias biossintéticas de ácido ascórbico em aminais (reações de 1-8) e em plantas (reações de 9-24). 16

Figura 3. Cloroplasto. 18

Figura 4. Síntese de sacarose na fase escura da fotossíntese. 19

Figura 5. Padrão de ácido ascórbico (A), suco de lima ácida convencional (B) e suco de lima ácida biodinâmica (C). 25

Figura 6. Padrão de frutose, glicose e sacarose (A), suco integral de lima ácida convencional (B) e suco de lima ácida biodinâmica (C). 28

Figura 7. Volume de distribuição (%) do tamanho de partículas em suco de lima ácida convencional (LC) e orgânica biodinâmica (LB). 41

Figura 8. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida convencional, hidrolisado com Citrozym cloudy® 100 L. 42

Figura 9. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Citrozym cloudy® 100 L. 43

Figura 10. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida convencional hidrolisado com Citrozym ultra® L. 45

Figura 11. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Citrozym ultra® L. 46

Figura 12. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida convencional hidrolisado com Pectinex®. 48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição de suco de limão (*Citrus limon*, L., Burn) segundo o MAPA (2000). 8

Quadro 2. Composição nutricional de lima (*Citrus latifolia*) e de limão (*Citrus limon*). 9

Quadro 3. Capacidade antioxidante de cítricos provenientes de cultivo convencional e ecológico. 11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento dos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica. 24

Tabela 2. Sólidos solúveis, pH, acidez e vitamina Cdos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica. 25

Tabela 3. Concentração de glicose, frutose e sacarose em suco de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica. 28

Tabela 4. Minerais nos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica. 29

Tabela 5. Concentração de enzima x tempo de incubação a 30°C. 40

Tabela 6. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida convencional hidrolisado com Citrozym cloudy® 100 L. 44

Tabela 7. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Citrozym cloudy® 100 L. 44

Tabela 8. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida convencional hidrolisado com Citrozym ultra® L. 47

Tabela 9. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Citrozym ultra® L. 47

Tabela 10. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida convencional hidrolisado com Pectinex®. 50

Tabela 11. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Pectinex®. 51

RESUMO

RANGEL, Carolina Netto. **Lima ácida (C*itrus latifolia*, Tanaka.) cv. *Tahiti* cultivada em lavouras convencional e biodinâmica: caracterização física e química do suco e otimização da hidrólise enzimática.** 2007. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Tendo em vista a necessidade de caracterizar frutos obtidos por cultivo agroecológico, bem como compará-los àqueles provenientes de cultivo convencional; o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição físico-química e otimizar a hidrólise enzimática de sucos obtidos de lima ácida cv. *Tahiti* cultivadas pelos métodos convencional e biodinâmico. Foram estudadas limas ácidas *Tahiti*, obtidas em plantios convencional (LC) e biodinâmico (LB). A matéria-prima, proveniente do estado de São Paulo, foi selecionada, pesada e higienizada e o suco foi extraído, peneirado, acondicionado em recipientes de PVC e armazenado em freezer a –10°C. Foram realizadas nos sucos, as seguintes análises: pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis totais (°Brix), teores de frutose, glicose, sacarose, ácido ascórbico, minerais e tamanho de partículas. Foram determinados, por pesagem, o rendimento dos sucos e o percentual de cascas. Os dados foram analisados no programa *Statistica* 5.1, pelo teste t-student e pela análise de variância (ANOVA), e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste *Least Significance Difference* (LSD) em nível de 5% probabilidade.

Observou-se que as limas ácidas provenientes de cultivo convencional e biodinâmico não diferem significativamente entre si, quanto ao pH, acidez, ácido ascórbico, sacarose, cálcio e zinco. Entretanto, os frutos biodinâmicos apresentaram percentual de cascas mais elevado, e teores de frutose, glicose, K, Mn, Fe, Cu e rendimento de suco, significativamente menores do que os frutos convencionais. Na hidrólise enzimática com as enzimas Citrozym Cloudy® e Pectinex®, a condição ideal, tendo como base a redução do tamanho de partículas, é 0,3% de enzima incubados por 60 minutos (0,3/60), tanto para LC quanto para LB. Para a Citrozym Cloudy®, observou-se que a condição 0,3/60 acarretaria a redução da concentração de glicose, apenas no LC; enquanto que nestas mesmas condições a Pectinex® levaria a um aumento nos teores de sacarose, em ambos os sucos. No caso da Pectinex®, também se mostraram eficazes na redução de tamanho de partículas, sem ocasionarem alterações no teor de açúcares as seguintes condições: para LC; 0,2% por 40 minutos (0,2/40) e para LB, 0,3% por 20 minutos (0,3/20). A Citrozym Ultra® poderia ser aplicada a ambos os sucos, na condição de 0,2/40, com resultados satisfatórios, acarretando a elevação do teor de glicose no suco LC.

Palavras chave: *Citrus latifolia, cultivo biodinâmico, hidrólise enzimática*

ABSTRACT

RANGEL, Carolina Netto. **Acid Lime (C*itrus latifolia*, Tanaka.) cv. *Tahiti* proceeding from conventional and biodynamic crops: physical and chemical juice characterization and enzymatic hydrolysis optimization.** 2008. 62p. Dissertation (Master Science in Food Science and Tecnology.). Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

In order to characterize the agroecological fruits, as well as the comparison of this to the fruit proceeding from conventional production; the present work had as objective to evaluate the physical and chemical composition and optimize the enzymatic hydrolysis of acid lime juice, cv. *Tahiti* cultivated by conventional and biodynamic methods.Were evaluated acid limes *Tahiti* from conventional (CL) and biodynamic (BL) crops. The raw material (from São Paulo state – Brazil) was selected, weighted, higienized and the juice was extracted, bottled, conditioned in identified PVC containers and stored under freezing at -10°C. Were analysed pH, total acidity, total soluble solids (°Brix), fructose, glucose, sucrose, ascorbic acid, minerals an particules size in acid lime juice. The juice yield and the peels percentage were calculated by weight difference. The statistical analysis applied were the analysis of variance (ANOVA) and the comparison among the averages of treatments was accomplished by the Least Significance Difference (LSD) test at the level of 5% of probability. There were no significant differences in total titrable acidity, pH, ascorbic acid, sucrose, calcium and zinc between acid lime juice from biodynamic and conventional crops. In view of this, it could be conclude that the differences between both production methods do not change these nutrients concentration in final product. There were no significant differences in total titrable acidity, pH, ascorbic acid, sucrose, calcium and zinc between acid lime juice from biodynamic and conventional crops. On the other hand, the biodynamic fruits presented lower fructose, glucose, total soluble solids contents, potassium, manganese, iron and copper. Additionally, presented higher peels percentage than the LC, promoting lower juice yield in the biodynamic samples. The great hydrolysis conditions for Citrozym Cloudy and Pectinex were 0.3/60, in CL and BL. However, the glucose contend reduces in CL, if use Citrozym Cloudy at these conditions. Using Pectinex, at these same conditions, sucrose contends increases, in both groups. The 0.2/40 (for CL) and 0.3/20 (for BL), with Pectinex, could reduced the particles size without change sugars contends. In addiction, Citrozym Ultra could be used at 0.2/40 condition, resulting in a satisfactory particles size reduction, increasing the glucose contend.

Key words: *Citrus latifolia*, biodymanic production, enzymatic hydrolysis.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO

INTRODUÇÃO GERAL 1

2 CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE SUCO DE LIMA ÁCIDA (Citrus latifolia, TANAKA) CV. TAHITI, CONVENCIONAL E BIODINÂMICA. 2

RESUMO 3

ABSTRACT 4

2.1 INTRODUÇÃO 5

2.2 REVISÃO DE LITERATURA 6
2.2.1 Lima ácida (Citrus latifolia, Tanaka.), cv. Tahiti. 6
2.2.2 Parâmetros Físico-químicos em Frutos Cítricos 7
2.2.3 Agricutura Agroecológica 10
2.2.3.1 Histórico 10
2.2.3.2 O Sistema de Cultivo Orgânico 10
2.2.3.3 Agricultura Biodinâmica 11
2.2.4 Vitamina C (Ácido Ascórbico) 12
2.2.4.1 Histórico 12
2.2.4.2 Características físico-químicas 13
2.2.4.3 Biossíntese de ácido ascórbico 14
2.2.5 Açúcares (Frutose, Glicose e Sacarose) 16
2.2.5.1 Características físico-químicas 16
2.2.5.2 Biossíntese de carboidratos 17
2.2.6. Minerais 19

2.3 MATERIAL E MÉTODOS 21
2.3.1 Matéria – Prima 21
2.3.2 Obtenção do Suco 21
2.3.3 Rendimento do Suco 21
2.3.4 Análises Físico-Químicas e Instrumentais 21
2.3.4.1 pH e acidez titulável total 21
2.3.4.2 Sólidos solúveis totais (ºBrix) 21
2.3.4.3 Vitamina C (ácido ascórbico) 22
2.3.4.4 Açúcares: glicose, frutose e sacarose 22
2.3.4.5 Minerais 22
2.3.5 Análise Estatística 23

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 24
2.4.1 Rendimento de Suco 24
2.4.2 Sólidos Solúveis, Acidez Titulável e pH 25
2.4.3 Vitamina C (Ácido Ascórbico) 26
2.4.4 Açúcares (Frutose, Glicose e Sacarose) 27

2.4.5 Minerais 29

2.5 CONCLUSÕES 31

3 CAPÍTULO II – OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUCO DE LIMA ÁCIDA (Citrus latifolia, TANAKA) CV. TAHITI, CONVENCIONAL E BIODINÂMICA. 32

RESUMO 33

ABSTRACT 34

3.1 INTRODUÇÃO 35

3.2 REVISÃO DE LITERATURA 36
3.2.1 Celulose, Hemicelulose e Pectinas 36
3.2.2 Hidrólise Enzimática em Sucos de Fruta 37
3.2.3 Preparações enzimáticas 38

3.3 MATERIAL E MÉTODOS 39
3.3.1 Matéria – Prima 39
3.3.2 Obtenção dos Sucos 39
3.3.3 Otimização da Hidrólise Enzimática 39
3.3.4 Análise do Tamanho de Partículas 40
3.3.5 Açúcares: glicose, frutose e sacarose 40
3.3.6 Análise Estatística 40

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
3.4.1 Análise do Tamanho de Partículas dos Sucos Integrais 41
3.4.2. Hidrólise com Citrozym cloudy® 100 L 41
3.4.2.1. Análise do Tamanho de Partículas 41
3.4.2.2. Açúcares 44
3.4.3. Hidrólise com Citrozym ultra® L 44
3.4.3.1. Tamanho de partículas 44
3.4.3.2. Açúcares 47
3.4.4. Hidrólise com Pectinex® 48
3.4.4.1. Tamanho de partículas 48
3.4.4.2. Açúcares 50

3.5 CONCLUSÕES 52

4 CONCLUSÕES GERAIS 53

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, em vários países do mundo, um expressivo aumento no consumo de alimentos orgânicos tem sido observado. A manutenção da saúde e a preservação do meio ambiente são os principais fatores apontados para este aumento. Questões ambientais e a presença de contaminantes estão sendo estudadas; entretanto, ainda há poucos trabalhos quanto à caracterização global desses alimentos e de seus produtos processados (IFOAM, 2005)

Diversas condições pré-colheita podem vir a alterar a composição físico-química dos alimentos e, desta forma, diferentes métodos de cultivo poderiam resultar em frutos com características distintas. Considerando que a composição de um fruto está diretamente relacionada às suas características nutricionais, tecnológicas e sensoriais, torna-se relevante avaliar se estas características estão sendo alteradas ou não, por métodos de cultivo não-convencionais (MORILLAS RUIZ *et al*., 2005; CHINNICI *et al*., 2005; GARCIA-SANCHEZ *et al*., 2003)

A composição dos sucos de lima ácida, proveniente de diferentes variedades, foi descrita por alguns autores, porém a composição do suco obtido de cultivo biodinâmico ainda não foi reportada (MARÍN *et al*, 2002; ZIENA, 2000; PEDRÃO *et al*, 1999). Tendo em vista a necessidade de caracterização dessas matérias-primas, obtidas por cultivo não convencional, fazem-se necessários o estudo da composição da lima ácida, cv. *Tahiti*, cultivada no Brasil e a comparação desta ao fruto proveniente de plantio convencional.

De modo complementar, observa-se um aumento na demanda por produtos processados cujos nutrientes sejam mantidos. Para isto, processos alternativos ao tratamento térmico vêm sendo aplicados, como por exemplo, sistemas de filtração por membranas. Estes processos, como a microfiltração e ultrafiltração, podem ser aplicados a sucos de fruta, levando a esterelidade comercial a frio, além de manter o valor nutricional e as características sensoriais do produto. Entretanto, estes sistemas podem apresentar compactação de sólidos na superfície das membranas, reduzindo o fluxo do permeado, inviabilizando a filtração. A fim de reduzir este problema, sugere-se a realização da hidrólise enzimática prévia. Desta forma, pode-se reduzir o tamanho de partículas do suco, retardando o aparecimento da compactação na superfície da membrana (LEE *et al*., 2006; KLAHORST, 2003; NOVOZYMES, 1993).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos comparar a composição físico-química de sucos obtidos de lima ácida cv. *Tahiti* cultivadas pelos métodos convencional e biodinâmico; bem como, otimizar a hidrólise enzimática destes. Para isto, foram realizadas, em ambas as amostras, as análises de pH, sólidos solúveis, acidez em ácido cítrico, rendimento de suco, ácido ascórbico, frutose, glicose e sacarose. Além disso, avaliou-se o tamanho de partículas e os teores de frutose, glicose e sacarose, nos sucos hidrolisados com as enzimas comerciais Citrozym cloudy® 100L, Citrozym ultra® L e Pectinex®, em diferentes concentrações e tempos de incubação.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DE SUCO DE LIMA ÁCIDA *(Citrus latifolia,* TANAKA.) CV. TAHITI, CONVENCIONAL E BIODINÂMICA.

RESUMO

Tendo em vista a necessidade de caracterizar frutos obtidos por cultivo agroecológico, bem como compará-los àqueles provenientes de cultivo convencional, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição físico-química de sucos obtidos de lima ácida cv. *Tahiti* cultivadas pelos métodos convencional e biodinâmico. Foram estudadas limas ácidas *Tahiti*, obtidas em plantios convencional (LC) e biodinâmico (LB). A matéria-prima, proveniente do estado de São Paulo, foi selecionada, pesada e higienizada e o suco foi extraído, peneirado, acondicionado em recipientes de PVC e armazenado em freezer a –10°C. O pH e a acidez titulável total foram determinados em titulador automático e o teor de sólidos solúveis totais (ºBrix) em refratômetro. Os teores de frutose, glicose e sacarose e ácido ascórbico foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As medidas dos teores de minerais foram realizadas na linha de Fluorescência de raios X (TXRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – São Paulo. Foram determinados, por pesagem, o rendimento dos sucos e o percentual de cascas. Os dados foram analisados no programa *Statistica* 5.1, pela análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste *Least Significance Difference* (LSD) em nível de 5% probabilidade. Observou-se que as limas ácidas provenientes de cultivo convencional e biodinâmico não diferem significativamente entre si, quanto ao pH, acidez, ácido ascórbico, sacarose, cálcio e zinco. Isto indica que as diferenças empregadas nos dois métodos de produção; convencional e orgânico biodinâmico, não interfeririam no conteúdo deste nutrientes no produto final. Entretanto, alguns nutrientes mostraram-se mais sensíveis a estas variações, encontrando-se em quantidades distintas quando comparados os frutos convencionais e orgânico biodinâmicos da safra de maio/junho de 2005. Os frutos biodinâmicos apresentaram um percentual de cascas mais elevado e rendimento de suco, teores de frutose, glicose, potássio, manganês, ferro e cobre significativamente menores do que os frutos convencionais.

Palavras chave: Citrus latifolia, ácido ascórbico, cultivo biodinâmico, cultivo convencional

ABSTRACT

In order to characterize the agroecological fruits, the study of the organic lemon, cv. *Tahiti*, cultivated in Brazil becomes necessary; as well as the comparison of this to the fruit proceeding from conventional production. The present work had as objective to evaluate the physical and chemical composition of acid lime juice, cv. *Tahiti* cultivated by conventional and biodynamic methods. Were analised acid limes *Tahiti*, proceeding from conventional (CL) and biodinamica (BL) crops. The raw material (from São Paulo state – Brazil) was selected, weighted, higienized, and the juice was extracted, bottled, conditioned in identified PVC containers and stored under freezing at -10°C. The values of pH and total acidity had been determined by automatic tritation and the total soluble solids (°Brix) was measured in a refratometer. Fructose, glucose, sucrose and ascorbic acid were analised by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Minerals were measured using the μ-Synchrotron Radiation Excited X-ray Fluorescence microprobe (TXRF) from the National Laboratory of Light Synchrotron, Campinas - São Paulo. The statistical analysis applied was the analysis of variance (ANOVA) and the comparison among the averages of treatments was accomplished by the Least Significance Difference (LSD) test at the level of 5% of probability. There were no significant differences in total titrable acidity, pH, ascorbic acid, sucrose, calcium and zinc between acid lime juice from biodynamic and conventional crops. In view of this, it could be conclude that the differences between both production methods do not change these nutrients concentration in final product. On the other hand, some nutrients were affected when were compared the may/june 2005 harvests. The biodynamic fruits presented significant higher peels content and lower juice yield, fructose, glucose, total soluble solids, potassium, manganese, iron and copper contents.

Keywords: *Citrus latifolia*, ascorbic acid, biodymanic production, conventional production

2.1 INTRODUÇÃO

As condições pré-colheita podem vir a alterar a composição físico-química dos alimentos e, desta forma, diferentes métodos de cultivo poderiam resultar em frutos com características distintas. Considerando que a composição de um fruto está diretamente relacionada às suas características nutricionais, tecnológicas e sensoriais, torna-se relevante avaliar se estas características estão sendo alteradas ou não, por métodos de cultivo não-convencionais (MORILLAS RUIZ *et al*., 2005; CHINNICI *et al*., 2005; GARCIA-SANCHEZ *et al*., 2003)

A composição dos sucos de lima ácida, proveniente de diferentes variedades, foi descrita por alguns autores, porém a composição do suco obtido de cultivo biodinâmico ainda não foi reportada (MARÍN *et al*, 2002; ZIENA, 2000; PEDRÃO *et al*, 1999). Tendo em vista a necessidade de caracterização dessas matérias-primas, obtidas por cultivo não convencional, fazem-se necessários o estudo da composição da lima ácida, cv. *Tahiti*, cultivada no Brasil e a comparação desta ao fruto proveniente de plantio convencional.

O presente trabalho teve como objetivos comparar a composição física e química de sucos obtidos de lima ácida cv. *Tahiti* cultivadas pelos métodos convencional e biodinâmico. Para isto, objetivou-se determinar, em ambas as amostras, os valores de pH, sólidos solúveis, acidez em ácido cítrico, rendimento de suco, ácido ascórbico, frutose, glicose, sacarose, potássio, cálcio, manganês, ferro, cobre e zinco.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.1 Lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka.), cv. Tahiti.

A lima ácida faz parte de um grupo de *Citrus*, onde as duas espécies de maior valor comercial são *Tahiti* (*Citrus latifolia*) e Galego (*Citrus aurantifolia*), ambas com diversas variedades ou clones. A denominação "limão" é usualmente empregada, apesar de ser mais adequada aos limões verdadeiros (*Citrus limon*), como os do tipo Siciliano (TODA FRUTA, 2003).

A árvore da cultivar *Tahiti* é vigorosa, de tamanho grande e copa arredondada, precoce na entrada em produção e com várias floradas durante o ano. Entretanto, sua produção é mais concentrada no primeiro semestre do ano, no Estado de São Paulo (80% da produção nacional) e em regiões de clima semelhante. A colheita do fruto deve ser realizada de 120 a 160 dias após a florada, quando estiver bem desenvolvido, porém ainda verde. O peso médio do fruto pode variar de 70 a 135 g, com cerca de 50% de suco. Em média, apresentam 5 a 6 g/100g de acidez e 9°Brix. (TODA FRUTA, 2003).

A produção de lima *Tahiti* teve um grande incremento a partir da década de 60, por ser mais tolerante a doenças do que o "limão" Galego, que atualmente é cultivado apenas em alguns países, especialmente no México (TODA FRUTA, 2003). Desde meados da década de 80, a produção de frutos cítricos vem aumentando no mundo, sendo o limão amplamente cultivado em países de clima frio e/ou seco (oeste dos Estados Unidos, Espanha, Itália, Argentina, Egito, Irã, Índia). Por outro lado, as limas adaptam-se, exclusivamente, a climas tropicais, sendo o México e o Brasil os seus maiores produtores. A estimativa de produção mundial para o limão e a lima, em 2010, é de 10,34 milhões de toneladas, cerca de 14% superior a produção entre o período de 1997 a 1999 (FAO, 2003).

A cultura da lima ácida, cv. *Tahiti*, ainda é realizada, principalmente, por agricultores familiares e pequenos produtores (STUCHI & SILVA, 2005). Em 2003 a cultura da lima ácida *Tahiti* ocupava uma área plantada de 47.820 hectares, no Brasil. No estado de São Paulo há a maior área plantada (36.124 hectares), seguido pela região Nordeste com 5.519 hectares e produção de 54.448 toneladas/ano. Bahia, Sergipe, Ceará, Maranhão e Piauí são os principais produtores da região. A exportação do fruto cresceu, consideravelmente, sendo de 2.301 toneladas/ano em 1998, e atingindo 35.000 toneladas/ano em 2005. Apesar disso, a produtividade por pomar ainda é considerada pequena, sendo de 22,8 t/ha em São Paulo, 15,1 t/ha no Rio de Janeiro, 12,1 t/ha na Bahia e 12,5 t/ha de média nacional (STUCHI & SILVA, 2005).

O limão e a lima são utilizados *in natura* ou sob a forma de suco, especialmente, com a finalidade de participar na composição de *blends* a fim de incrementar o sabor de bebidas (FAO, 2003). Segundo ZIENA (2000), o suco de lima é largamente consumido, com diferentes aplicações. Dentre elas pode-se destacar o uso como condimento, como aromatizante (especialmente em alimentos cozidos e servidos quentes e saladas), como acidulante e na fabricação de limonada. É utilizado, ainda, para prevenir o escurecimento em frutas frescas utilizadas em xaropes e em conservas vegetais. No Brasil, o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para Suco de Limão (BRASIL, 2000) o define como: "bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da lima ácida (*Citrus aurantifolis*, L.), através de processo tecnológico adequado". Estabelece, ainda, a composição e as características correspondentes ao produto, com descrito no Quadro 1:

Quadro 1. Composição de suco de lima ácida (*Citrus aurantifolis*, L.) segundo o Ministério da Agricultura (BRASIL, 2000).

Composição	Mínimo	Máximo
Acidez titulável em ácido cítrico (g/100g)	5,00	-
Ácido ascórbico (mg/100mg)	20,0	-
Óleo essencial de limão (%v/v)	-	0,025

Fonte: (MAPA, 2000)

Quanto à cor, deve ser translúcida (branca) a amarelada, o aroma e o sabor próprios do fruto (BRASIL, 2000), visto que o desenvolvimento de sabor amargo é, mundialmente, o maior problema em produtos e sucos cítricos (BREKSA *et al.*, 2005).

2.2.2 Parâmetros Físico-químicos em Frutos Cítricos

Segundo CHINNICI *et al.* (2005), a determinação de açúcares e ácidos orgânicos em alimentos é de suma importância, já que sua presença e a relação °Brix/acidez titulável podem afetar as características químicas e sensoriais (pH, acidez total, estabilidade microbiana, doçura e aceitabilidade global) do alimento. Com isso fornecem informações fundamentais para a avaliação da segurança do alimento e a otimização de processos tecnológicos.

BEAN & TODD (1960) utilizando marcadores C^{14}, constataram que o flavedo (exocarpo; camada externa da casca) de laranjas verdes apresentava intensa capacidade de fixação de carbono, enquanto que no albedo (mesocarpo; camada branca da casca) e nas vesículas de suco esta capacidade era muito reduzida. Em contrapartida, quando no escuro, as vesículas de suco aumentavam, consideravelmente, sua capacidade de fixação de carbono, em relação aos demais tecidos. Neste caso, as substâncias mais amplamente formadas eram o ácido málico, a serina, o ácido aspártico e o ácido cítrico. Desta forma, concluíram que as reações de fixação de carbono, ocorridas na fase independente da luz na fotossíntese, eram fundamentais na formação e na estocagem de ácidos orgânicos em polpa de frutos cítricos.

GORINSTEIN *et al*. (2001) ao avaliarem os teores de ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e magnésio (Mg) em limão, laranja e pomelo descascados e em suas cascas, observaram que todos os minerais estavam presentes em maiores concentrações nas cascas dos frutos. Além disso, no limão tanto descascado quanto na sua casca, o ferro atingiu concentrações extremamente superiores aos demais frutos (cerca de 530 e 620µg/100g, respectivamente); enquanto que nos demais frutos houve uma variação em torno de 10 a 130µg/100g.

MARÍN *et al.* (2002) avaliaram o teor de alguns componentes de sucos de limão das variedades *Fino* ou *Mesero* e *Verna* (Murcia – Espanha) obtidos em diferentes sistemas de extração observando que a acidez variou de 7,70 a 5,53g/100mL; o teor de sólidos solúveis de 9,0 a 6,5g/100mL e de 532 a 261 g/100mL em ácido ascórbico, nos sucos obtidos, em processo não industrial (manual), por prensagem e filtração em tela de nylon.

PEDRÃO *et al.* (1999) avaliaram os teores de ácido ascórbico, ácido cítrico, sólidos solúveis e pH em sucos obtidos a partir de limão, cv. *Tahiti*, a serem adoçados para a obtenção de limonada encontrando 34mg/100mL; 5,56g/100mL; 8,9 °Brix e 2,75, respectivamente.

MOUFIDA & MARZOUK (2003) avaliaram a acidez titulável, o teor de açúcares totais, o pH e a acidez (em ácido cítrico e acido málico), em suco de limão cultivado na Tunísia encontrando os valores de 40,29g/L, 75,983g/L, 2,3; 53,3mgmL e 3,5mg/mL, respectivamente. Avaliaram, ainda, a composição em ácidos graxos, constatando que os mais abundantes foram: 14,20% de palmítico (C16:0), 21,04% de oléico (C18:1), 26,22% de linoléico (C18:2) e 9,77% de linolênico (C18:3); representando cerca de 71,24% do total de

ácidos graxos do suco de limão. Quanto ao aroma, o limoneno, substância volátil normalmente encontrada em maior abundância, representou 78,8% dos voláteis totais.

O *United States Department of Agriculture* - USDA (2005) reportou valores médios para vários nutrientes presentes na lima (*Citrus latifólia*, Tanaka) e no limão (*Citrus limon*, L.), e em seus produtos derivados. Alguns destes nutrientes estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Composição nutricional de lima (*Citrus latifolia*) e de limão (*Citrus limon*).

Nutrientes	Lima com casca	Suco de lima integral	Suco de lima enlatado / engarrafado	Limão com casca	Suco de limão integral	Suco de limão enlatado / engarrafado
Água (g/100g)	88,26	90,79	90,52	87,4	90,73	92,46
Energia (kcal)	30	25	88	20	25	21
Proteína (g/100g)	0,70	0,42	0,25	1,2	0,38	0,4
Lipídios totais (g/100g)	0,20	0,07	0,23	0,3	0	0,29
Carboidratos (g/100g)	10,54	8,42	6,69	10,70	8,63	6,48
Açúcares totais (g/100g)	1,69	1,69	1,37	*	2,4	2,4
Frutose (g/100g)	*	0,61	*	*	*	*
Glicose (g/100g)	*	0,60	*	*	*	*
Sacarose (g/100g)	*	0,48	*	*	*	*
Fibra dietética (g/100g)	2,8	0,4	0,4	4,7	0,4	0,4
Cinzas (g/100g)	0,30	0,31	0,31	0,40	0,26	0,36
Cálcio (mg/100g)	33	14	0,12	61	7	11
Ferro (mg/100g)	0,60	0,09	0,23	0,7	0,03	0,13
Magnésio (mg/100g)	6,0	8	7	12	6	8
Fósforo (mg/100g)	18,0	14	10	15	6	9
Potássio (mg/100g)	102,0	117	75	145	124	102
Sódio (mg/100g)	2,0	2	16	3	1	21
Zinco (mg/100g)	0,11	0,08	0,06	0,10	0,05	0,06
Cobre (mg/100g)	0,06	0,027	0,030	0,360	0,029	0,037
Manganês (mg/100g)	0,008	0,018	0,008	*	0,008	0,020
Selênio (mcg/100g)	0,4	0,10	0,1	*	0,1	0,1
Vitamina C (mg/100g)	29,1	30,0	6,4	77	46	24,8
Folato (mcg/100g)	8,0	10,0	8	*	13	10

*valores não reportados
Fonte: USDA (2005)

A composição química do suco de lima citada por ZIENA (2000) relata os seguintes valores: 10% de sólidos solúveis totais, de 5,1 a 7,7% de acidez total, de 0,24 a 0,50% de proteína, 0,4% de cinzas, de 39 a 62mg/100mL de ácido ascórbico, de 0,69 a 0,72% de açúcar invertido total, de 0,14 a 0,20% de açúcares não redutores, de 1,7 a 3,2 de pH, e um total de 15 a 17 aminoácidos. Dentre os aminoácidos os principais encontra-se a arginina (27,2mg/100g) e os ácidos aspártico (28,7 mg/100g) e glutâmico (20,2 mg/100g). Por outro lado, a metionina, a leucina e a isoleucina são os que encontravam-se presentes em menores quantidades, sendo; 0,3, 0,6 e 0,7mg/100g, respectivamente.

O benefício à saúde atribuído aos sucos de fruta deve-se, em parte, ao seu potencial antioxidante. GARDNER *et al.* (2000) apontaram a Vitamina C como responsável por 65-100% deste potencial em sucos cítricos. Quanto ao potencial antioxidante, MARÍN *et al.* (2002) constataram que no limão das variedades *Fino 49* e *Verna 50*, a parcela de contribuição da vitamina C foi de 66 e 33%, respectivamente. MORILLAS RUIZ *et al.* (2005) relataram que a capacidade antioxidante e a concentração de vitamina C, foram maiores em limões e tangerinas provenientes de cultivo ecológico do que naqueles de cultivo convencional. Contrariamente, foi observado em laranjas que os frutos convencionais possuiam maiores concentrações de vitamina C e capacidade antioxidante (Quadro 3).

Quadro 3. Capacidade antioxidante de cítricos provenientes de cultivo convencional e ecológico.

Amostra	**Capacidade antioxidante** (DPPH) (mM trolox)	**Capacidade antioxidante** (ABTS) (mM trolox)	**Ácido ascórbico** (mg/L)	**Ácido desidroascórbico** (mg/L)
Limão convencional	0,20 ± 0,02	56,91 ± 7,50	389,9 ± 7,5	1,7 ± 0,9
Limão ecológico	0,28 ± 0,02	75,58 ± 10,96	673,5 ± 7,9	Traços
Laranja convencional	0,13 ± 0,01	58,05 ± 4,15	154,8 ± 37,1	7,8 ± 2,0
Laranja ecológica	0,09 ± 0,00	54,25 ± 3,46	130,4 ± 53,1	7,9 ± 1,8
Tangerina convencional	0,12 ± 0,01	46,58 ± 2,88	156,9 ± 3,9	7,9 ± 1,7
Tangerina ecológica	0,20 ± 0,01	49,25 ± 1,25	284,2 ± 58,3	4,5 ± 1,3

Fonte: Morillas Ruiz *et al.* (2005)

Ao avaliar o efeito de diferentes métodos de extração do suco de limão (variedades *Fino 49* e *Verna 50*) sobre sua composição, MARÍN *et al.* (2002) constataram que, quando extraídos por métodos industriais, os sucos apresentaram maior concentração de flavonóides do que aqueles extraídos manualmente, sugerindo que no primeiro há uma possível contribuição do albedo e do flavedo, o que não ocorria na extração manual. Os autores relataram também que os flavonóides presentes em ambas as variedades de limão representaram de 10 a 16% do potencial antioxidante total dos sucos. Segundo CARISTI *et al.* (2005), o 6,8 – di - *C*-glucopiranosildiosmetina, é um flavonóide característico do suco de limão. Por outro lado, DEL CARO *et al*. (2004) não observaram correlação quanto aos flavonóides e o aumento do potencial antioxidante de frutos cítricos, associando este ao teor de ácido ascórbico.

aumento da salinidade e efeito inverso foi observado com o aumento da quantidade de água de irrigação.

JACOMINO *et al.* (2003) observaram alterações na acidez titulável e sólidos solúveis em limão "Siciliano", quando submetidos a atmosferas de armazenamento a 10^{o}C por 21, 28 e 35 dias, com diferentes concentrações de etileno.

2.2.3 Agricutura Agroecológica

2.2.3.1 Histórico

Durante a década de 1920 surgiram as primeiras correntes alternativas ao modelo industrial ou convencional de agricultura (DAROLT, 2005). Na década de 1940, o cultivo ou agricultura biológica, enfatizava o processo de compostagem na superfície do solo e testes especiais para avaliar sua fertilidade (STRINGHETA, 2003).

O cultivo convencional de matérias-primas de origem vegetal vem sendo questionado, uma vez que se baseia no preparo exaustivo do solo com a utilização de adubos minerais de alta solubilidade, agrotóxicos utilizados no controle de pragas, doenças e ervas daninhas e em cultivares de alta resposta a fertilizantes e agrotóxicos químicos sintéticos. Este cultivo engloba um pacote tecnológico dependente de insumos industrializados demandando alto consumo energético e gerando impacto negativo no meio ambiente e no ser humano (ALTIERI, 1995; EHLERS, 1996; GLIESSMAN, 2000).

2.2.3.2 O Sistema de Cultivo Orgânico

Segundo a Secretaria de Defesa Agropecuária (BRASIL, 1999), o sistema orgânico de produção é todo aquele que adota tecnologias que otimizem os recursos naturais. Este abrange os cultivos ecológico, biodinâmico, natural, sustentável, regenerativo, biológico e agroecológico.

Diferentemente, DAROLT (2005) agrupa o movimento orgânico em quatro grandes vertentes: agricultura biodinâmica, biológica, orgânica e natural. Atualmente, a expressão "agricultura orgânica" é utilizada em países de origem anglo-saxã, germânica e latina. Pode ser considerada como sinônimo de agricultura biológica e engloba as práticas agrícolas da agricultura natural e da biodinâmica.

Estudos mostram que tanto o sistema de cultivo orgânico quanto o biodinâmico apresentam solos de alta qualidade biológica e física e, em alguns casos até química, quando comparados ao plantio convencional (REGANOLD, 1992).

O crescimento da fertilidade e da eficiência do solo na cultura orgânica tem sido significativo. A atividade dos microorganismos no solo contribui consideravelmente neste sistema de produção, mantendo os insumos dos recursos não-renováveis e a alta fertilidade, além de uma melhor estrutura do solo. Assim conserva-se a biodiversidade do solo, apesar do uso deste, pois não há utilização de fertilizantes e pesticidas químicos. Portanto a atividade e a diversidade de microorganismos e sua eficiente utilização das fontes de carbono orgânico no solo são responsáveis pela relevância deste cultivo (Fibl, 2002).

Ao avaliar a sustentabilidade dos sistemas de cultivo convencional e ecológico em Bangladesh, RASUL & THAPA (2004) constataram que o segundo foi uma alternativa viável ao cultivo convencional, sendo relativamente mais sustentável. PUSSEMIER *et al*. (2005) observaram que quanto á presença de contaminantes tóxicos conhecidos (pesticidas, nitratos, entre outros), os produtos orgânicos apresentavam vantagens claras. Entretanto, apontaram a necessidade de melhor identificar contaminantes naturais nesse tipo de produção, uma vez que

contaminantes ambientais ou provenientes do processamento de alimentos podem estar presentes em ambos os produtos, tanto orgânicos quanto convencionais.

O estilo de vida da população e questões ambientais são fatores chave para explicar o consumo de alimentos orgânicos, e devem ser considerados ao delinear estratégias de produção e mercado (GIL *et al.*, 2000). Por outro lado, estudos constataram que fatores pessoais, como a própria saúde e o sabor do alimento são mais importantes, para grande parte dos consumidores de alimentos orgânicos, do que fatores como preservação do meio-ambiente, bem-estar dos animais ou considerações sociais (IFOAM, 2005).

O sistema internacional de credenciamento visa garantir a integridade orgânica do produto, o que requer um sistema regular de inspeção e certificação visando assegurar a credibilidade dos produtos certificados garantindo assim, a confiança do consumidor. Por isso, todo produto orgânico deve ser processado de forma que sua característica orgânica seja preservada, oferecendo realmente produtos de qualidade, nutritivos e orgânicos (IBD, 2004).

A produção e o consumo de alimentos orgânicos crescem em diversos países. Entretanto, um dos obstáculos apontados para esse crescimento é a disparidade de preços entre estes alimentos e os convencionais. Em países como a Alemanha e a Dinamarca, onde os preços são semelhantes entre si, o consumo de orgânicos é muito maior (GIL *et al.*, 2000)

2.2.3.3 Agricultura Biodinâmica

Segundo REIJNTJES (1994), a agricultura biodinâmica é uma forma de agricultura orgânica baseada na antroposofia. Esta pode ser caracterizada como um método de conhecimento da natureza do ser humano e do universo, que amplia o conhecimento obtido pelo método científico convencional, bem como tem aplicação em diversas áreas da vida humana (SAB, 2005).

A agricultura biodinâmica se diferencia das demais devido a uma série de princípios básicos. O primeiro ponto a se destacar é a visão da fazenda como um organismo integrado, diversificado e auto-sustentável. Neste sistema os diversos setores se apóiam mutuamente, constituindo um ciclo fechado de nutrientes em que a compra de insumos é gradativamente reduzida a um mínimo, tendendo a zero (ÁVILA, 2000). Para Rudolf Steiner não existe qualquer possibilidade de monocultura biodinâmica ou orgânica. A diversidade é, portanto, o ponto-chave para este tipo de agricultura (REIJNTJES, 1994).

Os preparados biodinâmicos são certificados e fiscalizados, sendo o credenciamento de produtores de reconhecimento mundial (STRINGHETA, 2003). Esse método diferencia-se dos não-convencionais em vários pontos:

- A interligação e interdependência da propriedade agrícola com a fauna, flora, solo, cursos d'água e o ser humano;
- A harmonia com o meio ambiente promovida pelo equilíbrio paisagístico e ecológico (plantação de árvores, entre outros);
- A recuperação de áreas com flora nativa;
- A interação entre produção vegetal e animal e aproveitamento dos resíduos na elaboração de compostos dentro da propriedade agrícola;
- A observação das constelações e dos astros e;
- A utilização de preparados biodinâmicos à base de extratos vegetais e de soluções orgânicas e minerais, incorporados às pilhas de compostagem ou aplicados diretamente sobre o solo e as plantas. (STRINGHETA, 2003).

SIXEL (2002) destaca ainda dez preceitos fundamentais em que se baseia o método biodinâmico de cultivo. São eles:

- A correção do solo, visando fornecer à planta material para que através da transmutação biológica dos elementos químicos, ela possa elaborar seus próprios nutrientes;
- A utilização de biofertilizantes e compostos a fim de corrigir eventuais deficiências de nutrientes e micronutrientes no solo.
- O preparo do solo para melhorar sua estrutura física, preparar as sementes e evitar capinas desnecessárias.
- Aumentar a produção e reciclagem de biomassa, a diversificação de espécies, criar novos eco-nichos e um modelo de sucessão de ecossistemas, através dos sistemas agroflorestais;
- Promover a manutenção e diversificação das espécies, respeitando a fauna e a flora nativas, além de aceitar as exóticas.
- Realizar um planejamento paisagístico evitando ao máximo remover a terra, compondo o planejamento dentro de sua microbacia.
- Respeitar a vida econômica da individualidade agrícola, escolhendo criteriosamente as linhas produtivas, harmonizando as inclinações pessoais com as necessidades sociais e as predisposições naturais da região.
- Buscar não só a cura e a sanidade da terra, mas também sua santificação.
- Orientar todos os afazeres cotidianos da lide agrícola pelos movimentos de constelações e dos astros.
- E por fim, utilizar os preparados biodinâmicos, que são compostos específicos à base de ervas medicinais, chifres, esterco e sílica.

2.2.4 Vitamina C (Ácido Ascórbico)

2.2.4.1 Histórico

As vitaminas possuem composições químicas diversas, e podem ser definidas como substâncias orgânicas que devem ser fornecidas em pequenas quantidades a partir do ambiente, porque não são sintetizadas pelos seres humanos ou, sua taxa de síntese é inadequada para a manutenção da saúde (MARCUS & COULSTON, 1991).

O escorbuto, doença causada pela deficiência de vitamina C, é conhecido desde meados do século XI, especialmente entre populações com dietas insuficientes em frutas e legumes por longos períodos. Com a introdução da batata na alimentação européia, no século XVII, a incidência de escorbuto foi reduzida. Entretanto, até o século seguinte a doença ainda continuava a ser um grande problema para as tripulações envolvidas em longas viagens marítimas. Ao longo do século XVI, vários comandantes curaram a doença com a administração de suco de limão aos tripulantes. Entretanto um estudo realizado em 1747 por Lind, um médico da British Royal Navy, foi o marco para provar a associação entre a dieta e o escorbuto. Neste estudo, os doentes que ingeriram frutas cítricas recuperaram-se rapidamente, o que levou a introdução de suco de limão à dieta das tripulações da British Navy, em 1800. (MARCUS & COULSTON, 1991).

HARDEN & ZILVA (1918) estudaram os efeitos antiescorbúticos do suco de limão, mesmo antes de associá-los ao ácido ascórbico. Em 1928, SZENT-GYÖRGYI isolou, de repolho cru e das glândulas supra-renais, um agente redutor na forma pura. Em 1932 este composto foi identificado por WAUGH & KING como o fator ativo antiescorbútico no suco de limão (MARCUS & COULSTON, 1991). Sua estrutura química foi logo estabelecida em vários laboratórios e a denominação comum de ácido ascórbico foi empregada para referir-se a sua função na prevenção de escorbuto (MARCUS & COULSTON, 1991). Em trabalho

posterior SVIRBELY & SZENT-GYÖRGYI (1932) confirmaram a estreita relação entre a prevenção do escorbuto e a ingestão de ácido ascórbico.

Assim, a determinação da concentração de ácido ascórbico tornou-se importante, e o método de TILLMANS *et al*. (1932) passou a ser largamente utilizado. Este método correlaciona o poder redutor da amostra com seu conteúdo de ácido ascórbico, e consiste na titulação do extrato da amostra preparado com ácido tricloroacético, com 2,6 diclorofenolindofenol (AHMAD, 1935).

A partir de então, o teor de vitamina C e os métodos de conservação desta em alimentos passaram a ser avaliados. HASSAN & BASILI (1932) observaram que doses crescentes de suco de lima reduziam a incidência de escorbuto em cobaias, mas que ao estocar o suco por 2 meses o efeito benéfico era perdido. Estudos de BENNETT & TARBERT (1933) constataram ainda que o poder redutor de suco de limão e laranja decrescia gradualmente quando estes eram submetidos a forte acidificação, pasteurização ou fervura.

2.2.4.2 Características físico-químicas

A L-threo-hex-2enono-1,4-lactona é uma cetolactona de seis carbonos, estruturalmente relacionada a glicose e outras hexoses, cuja nomenclatura trivial é ácido ascórbico. Este é oxidado reversivelmente no organismo em ácido desidroascórbico, que também possui atividade de vitamina C. A atividade antiescorbútica do ácido ascórbico encontra-se quase que totalmente em seu isômero L. Um outro isômero, o ácido D-isoascórbico (ou ácido eritórbico, ou ácido D-araboascórbico), possui potencial redox semelhante ao ácido ascórbico apesar de sua atividade antiescorbútica ser muito fraca. (MARCUS & COULSTON, 1991).

O ácido ascórbico é extremamente solúvel e tem propriedades acidulante e fortemente redutoras, que se devem a estrutura enediol conjugada com o grupo carbonil no anel lactona. Em solução, a hidroxila C-3 rapidamente se ioniza (pK_1 = 4,04 a 25°C) e a solução de ácidos livres se dá a pH 2,5. A segunda hidroxila é mais resistente a ionização (pK_2 = 11,4). A absorção na faixa de ultra-violeta (UV) é moderada, e dependente do pH. Em pH 2 o comprimento de onda (λ) máx é de 244 nm, enquanto que na faixa de pH de 6 a 10 este sobre para 266nm e chega a 294nm em pH maior do que 10 (TANNENBAUM, 1976).

O ácido ascórbico sofre oxidação facilmente, sendo rapidamente destruído pela exposição ao ar, sobretudo em meio alcalino e na presença de cobre como catalizador (MARCUS & COULSTON, 1991). Em alimentos ricos em ácido ascórbico, como sucos de frutas, as perdas são normalmente devidas a reações de escurecimento não enzimático (TANNENBAUM, 1976).

Assim como os carotenóides, o α-tocoferol e os flavonóides, por exemplo, o ácido ascórbico possui uma importante função antioxidante. Desta forma, o ascorbato é o principal antioxidante em células vegetais, e é encontrado em todos os compartimentos subcelulares, em concentrações que variam de 2 a 25mM. A oxidação do ascorbato é induzida por oxigênio (O_2), superóxido (O_2^-), oxigênio singlete ($^1O_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultando em monodeidroascorbato (MDHA). E este pode ser convertido em deidroascorbato ou reconvertido em ascorbato (Figura 1) (SMIRNOFF, 2000).

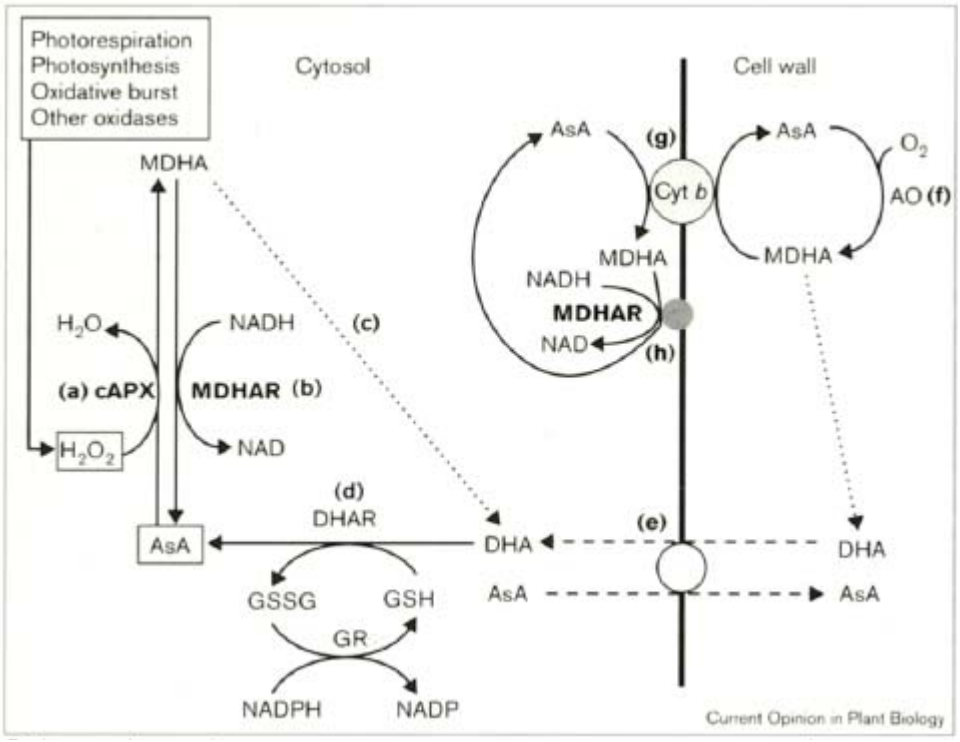


Figura 1. Reações redox e transporte de ascorbato (AsA). Estão descritas as reações ocorridas no citosol e o transporte através da membrana plasmática. **(a)** redução do peróxido de hidrogênio e oxidação do ascorbato, catalizada pela ascorbato peroxidase citosólica (cAPX). **(b)** produto de oxidação radical monodeidroascorbato (MDHA), é reduzido a ascorbato pela NAD(P)-dependente MDHA redutase (MDHAR). **(c)** duas moléculas de MDHA podem ser convertidas a deidroascorbato (DHA) e ascorbato (reações representadas não estequiométricamente por linhas pontilhadas). **(d)** DHA é reduzido a ascorbato pela glutationa (GSH)-dependente glutationa redutase (DHAR), que é regenerada a sua forma oxidada (GSSG) pela glutationa redutase (GR). **(e)** AsA é transportado para dentro da parede celular por difusão facilitada, sendo trocado pelo DHA, através de um transportador de membrana. **(f)** ascorbato oxidase (AO) é uma glicoproteína secretada que catalisa a oxidação do ascorbato na parede. **(g)** o MDHA resultante é provávelmente reduzido por um sistema citocromo *b*. É provável que o ascorbato ciosólico seja o doador de elétrons e que **(h)** um transportador de membrana palsmática MDHAR, localizado no citosol, regenere o ascorbato.

Fonte: SMIRNOFF, 2000.

2.2.4.3 Biossíntese de ácido ascórbico

A maioria dos mamíferos sintetiza ácido ascórbico, com exceção dos seres humanos, dos primatas não-humanos, do cobaio e de certas espécies de morcegos de frutas na Índia. Isto ocorre porque estes mamíferos não possuem a enzima hepática responsável pela última reação da síntese; a conversão de 1-gulonolactona em ácido L-ascórbico; sendo esta enzima mutante e não-funcional. Por isto, a vitamina C necessária é obtida através das plantas, onde o ácido ascórbico é uma substância muito abundante em todos os compartimentos celulares, inclusive na parede celular e chegando a concentrações superiores 20m*M* nos cloroplastos. (MARCUS & COULSTON, 1991; SMIRNOFF & WHEELER, 2000; LAING *et al*., 2004; VALPUESTA & BOTELLA, 2004).

Possivelmente o ascorbato possui funções na fotossíntese, como cofator enzimático nas sínteses de etileno, giberelinas e antocianinas, e ainda no controle do crescimento celular. Desta forma, uma alta atividade de ascorbato oxidase na parede celular tem sido correlacionada às áreas de rápida expansão celular. Entretanto, ainda não se sabe se esta é uma correlação apenas casual, e qual seria o seu mecanismo (SMIRNOFF & WHEELER,

2000). O ácido ascórbico também está relacionado ao tempo de florescência, à senescência, à morte celular programada e à respostas a patógenos através de uma complexa rede de transdução de sinal (BARTH *et al*., 2006). CHEN *et al*. (2003) sugerem que o conteúdo de ascorbato em plantas pode ser aumentado através do aumento da expressão gênica da enzima responsável por reconverter o ácido deidroascórbico em ácido ascórbico (deidroascorbato redutase), promovendo a reciclagem deste.

A via de biossíntese de ácido ascórbico ainda não foi totalmente compreendida, havendo algumas enzimas desconhecidas, que apenas se pressupõe existir (LAING *et al*., 2004). Há vários anos têm se tentado estabelecer esta via, e trabalhos mais recentes têm revelado que esta é mais complexa do que se esperava e que pode haver múltiplas vias de biossíntese de ácido ascórbico em plantas (VALPUESTA & BOTELLA, 2004).

A biossíntese do ácido ascórbico via GDP-mannose, GDP-L-galactose, L-galactose e L-galactono-1,4-lactona foi proposta recentemente e é sustentada por evidências de genética molecular. Outras vias, como a do ácido urônico, podem prover menores quantidades de ascorbato. Em algumas espécies de plantas, o ascorbato é um precursor de tartarato e oxalato. Além disso, tem um papel fundamental na fotossíntese, agindo na reação de peroxidase de Mehler, com a ascorbato peroxidase, para regular a condição redox dos carreadores de elétrons fotossintéticos e como cofator para a violaxantina d-epoxidase, uma enzima envolvida na fotoproteção ciclomediada pela xantofila. (SMIRNOFF & WHEELER, 2000).

Segundo VALPUESTA & BOTELLA (2004), evidências bioquímicas demonstram que há dois fatores envolvidos na biossíntese de ácido L-ascórbico em plantas. Um deles seria que, diferentemente do que foi encontrado em fígado de ratos, não há a inversão do esqueleto de carbono. E o outro fator é a ocorrência da L-galactona-1,4-lactona como precursor imediato do ácido L-ascórbico (Figura 2). Esta via envolve a conversão da GDP-D-manose em GDP-L-galactose, catalizada pela GDP-D-manose-3',5'-epimerase. A L-galactose liberada dos nucleotídeos é o precursor imediato da L-galactona-1,4-lactona, que é convertida em ácido ascórbico pela ação de uma desidrogenase (Figura 2). Com exceção da última etapa, que se passa na membrana interna mitocondrial, a via é citosólica; compartilhando intermediários GDP-açúcares com a síntese de glicoproteínas e de polissacarídeos de parede celular (SMIRNOFF, 2000). Por exemplo, durante o amadurecimento do morango, o D-galacturonato proveniente do *turnover* das pectinas da parede celular pode ser utilizado para a síntese de ácido ascórbico. De outra forma, em flores e folhas de *Arabidopsis*, a codificação gênica da myo-Inositol oxigenase ocorre primeiramente, e leva a produção de ácido D-glucorônico. Este pode seguir tanto a via de síntese de ácido ascórbico, quanto servir de precursor para a síntese de polímeros da parede celular, como a pectina e a hemicelulose. Desta forma, tecidos verdes podem favorecer uma ou outra via, de acordo com a ativação de luz ou do requerimento de grandes reservas de carbono (VALPUESTA & BOTELLA, 2004). Em mudas de agrião, metil ésteres de ácido D-galacturônico podem levar a um aumento na concentração de ácido ascórbico (DAVEY *et al*., 1999). Além disso, LOEWUS & KELLY (1961) observaram que o ácido D-galactuônico-1-^{14}C é metabolizado a ácido L-ascórbico-6-^{14}C, em uma via de inversão, durante o amadurecimento de morango. Foi proposta então a via do ácido urônico, que se ajusta a ambos os achados. Nesta via, derivados pectínicos do ácido D-galacturônico são reduzidos a ácido L-galactônico, que é espontaneamente convertido a L-galactona-1,4-lactona. E esta, pela ação da L-galactona-1,4-lactona desidrogenase, é então convertida a ácido L-ascórbico (Figura 2) (VALPUESTA & BOTELLA, 2004).

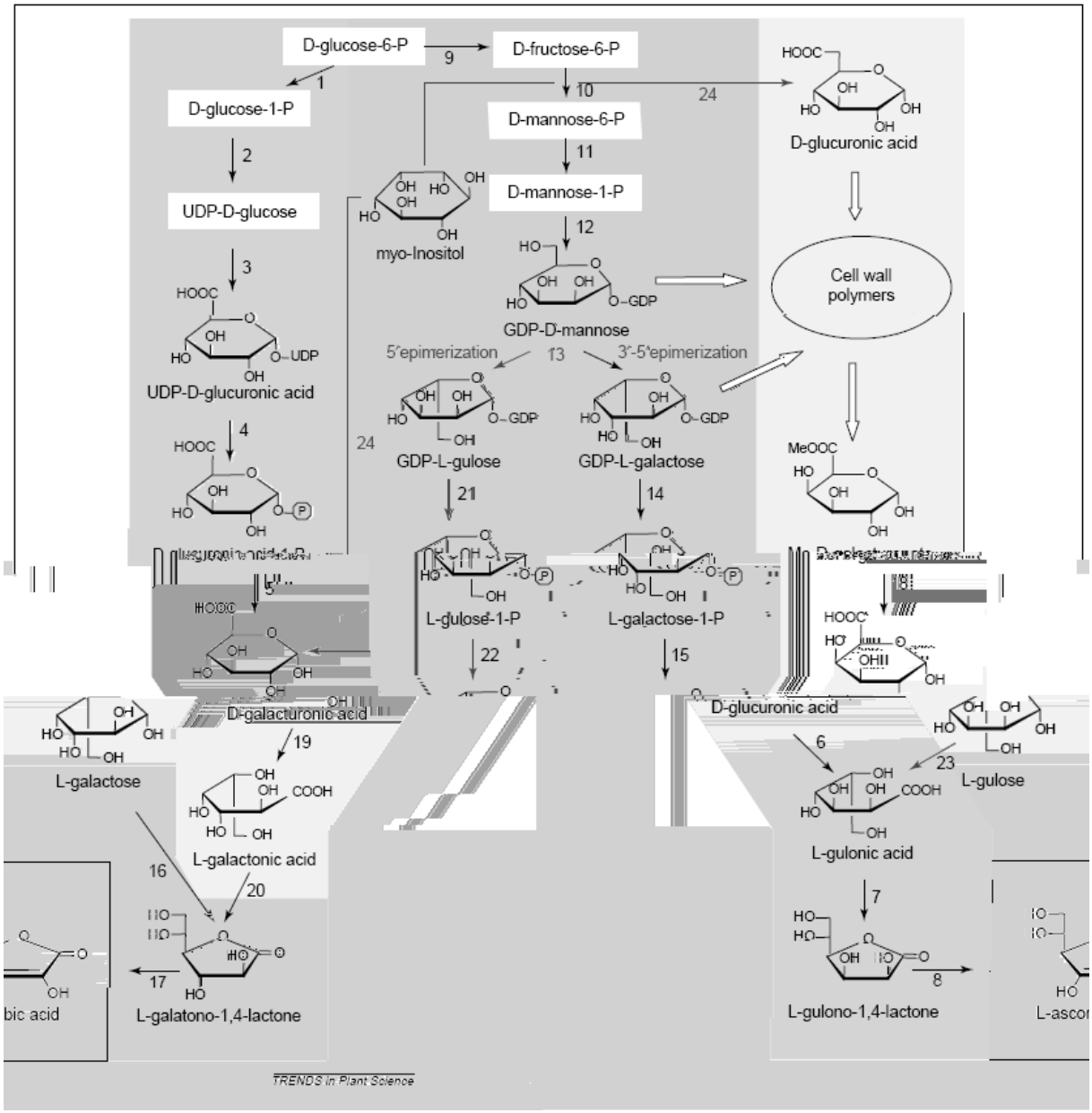


Figura 2. Vias biossintéticas de ácido ascórbico em aminais (reações de 1-8) e em plantas (reações de 9-24). Enzimas que catalizam as reações numeradas são: 1. fosfoglicomutase; 2. UDP-glicose pirofosforilase; 3. UDP-glicose desidrogenase; 4. glucuronato-1-fosfato uridiltransferase; 5. glucurono quinase; 6. glucuronato redutase; 7. aldono-lactonase; 8. glucono-1,4-lactona desidrogenase; 9. glicose-6-fosfato isomerase; 10. manose-6-fosfato isomerase; 11. fosfomanomutase; 12. GDP-manose pirofosforilase (manose-1-fosfato guaniltransferase); 13. GDP-manose-3',5'-epimerase; 14. fosfodiesterase; 15. açúcar fosfatase; 16. L-galactose desidrogenase; 17. L-galactono-1,4-lactona desidrogenase; 18. metilesterase; 19. DD-galacturonato redutase; 20. aldono-lactonase; 21. fosfodiesterase; 22. açúcar fosfatase; 23. L-glicose desidrogenase; 24. *myo*-Inositol oxigenase.

Fonte: VALPUESTA & BOTELLA, 2004.

2.2.5 Açúcares (Frutose, Glicose e Sacarose)

2.2.5.1 Características físico-químicas

Os açúcares geralmente são sólidos cristalinos, incolores e têm sabor doce (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Segundo a FAO (1998) o termo "açúcares" é convencionalmente

utilizado para designar mono e dissacarídeos. O termo “açúcar” refere-se à sacarose purificada, assim como as expressões “açúcar refinado” e “açúcar de adição”. Dentre os açúcares a sacarose se destaca, sendo o principal composto utilizado como adoçante. Comparando-se a doçura relativa dos principais açúcares, observa-se que a glicose apresenta 67% e a frutose 130% de doçura, em relação à sacarose. Apesar de as principais fontes deste açúcar serem a cana-de-açúcar e a beterraba, a sacarose é encontrada em todas as plantas que realizam fotossíntese (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

A glicose e a frutose são monossacarídeos, ou seja, carboidratos que não podem ser hidrolisados a açúcares de menor peso molecular. A glicose é uma aldose com seis átomos de carbono, encontrada em grande quantidade na natureza, cujos polímeros podem dar origem a polissacarídeos como o amido, a celulose e o glicogênio. A frutose também é constituída de seis átomos de carbono, entretanto é uma cetose. A sacarose é um dissacarídeo não-redutor formado a partir de uma molécula de glicose e uma de frutose. (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Nos alimentos vegetais ocorrem naturalmente alterações na composição dos carboidratos, durante a maturação e o amadurecimento pós-colheita. Entretanto, os frutos cítricos, que amadurecem ainda na árvore e não contêm amido, sofrem muito poucas alterações na composição de carboidratos, no período pós-colheita (HODGE & OSMAN, 1976). Apesar disto, durante a estocagem do suco de lima ácida sob refrigeração ou congelamento ocorre um aumento pronunciado da concentração de açúcares redutores, especialmente sob temperatura de refrigeração. Por outro lado o conteúdo de açúcares totais decresce nestas condições (ZIENA, 2000).

Alguns açúcares, como por exemplo, a D-glicose, a D-galactose e a D- frutose, são absorvidos ativamente pela parede do intestino humano, para a utilização em processos metabólicos. Entretanto, outros açúcares de mesmo peso molecular ou até menores, como a 2-deoxy-D-glicose, a D-manose, a L-arabinose e o L-sorbato, são absorvidos em quantidades insignificantes. Acredita-se que interações semelhantes estejam envolvidas na percepção do sabor doce, no quelamento de íons metálicos e nas reações de aglutinação celular de certas proteínas (lectinas). Nestes casos, o grupamento hidroxil parece ter um papel fundamental (HODGE & OSMAN, 1976).

2.2.5.2 Biossíntese de carboidratos

A principal fonte de calorias para grande parte da população mundial, são os carboidratos. Além disso, em plantas, estes compõem o mais importante suprimento de energia utilizável proveniente da luz solar, através da fotossíntese. Nesta, por intermédio da irradiação solar nas células fotossintéticas, o dióxido de carbono e a água são convertidos em carboidratos (HODGE & OSMAN, 1976).

Este processo envolve duas fases, uma dependente e outra independente da luz. A fase dependente da luz ocorre durante a incidência de luz solar sobre as plantas de folhas verdes. Nesta fase os elétrons da clorofila *a* e dos pigmentos acessórios (clorofila *b*, carotenóides), situados na membrana tilacóide dos cloroplastos (Figura 3), são excitados à uma camada energética superior. Ocorre então o transporte de elétrons aos seus aceptores, desencadeando reações de oxi-redução. Isto resulta na oxidação da água a oxigênio livre, com a formação de coenzimas reduzidas (KLUGE, 2002).

Na fase independente da luz, que se passa no estroma dos cloroplastos, o dióxido de carbono é fixado e reduzido a05 T30.0000.0895 9 /P 4(nio da)27 -0.021.5Tw 17.705 tzidredm

celular, fibras, tegumento, casca) que contêm os estoques alimentares de amido, sacarose e seus produtos de hidrólise (HODGE & OSMAN, 1976; KLUGE, 2002).

A base para o controle da acumulação de metabólitos em plantas durante o crescimento é de especial interesse no estudo do crescimento dos frutos a partir do momento em que o aroma e a qualidade destes dependem das substâncias estocadas. Laranjas e limões, por exemplo, possuem diferenças marcantes nas vias de estocagem de açúcares. O limão maduro, em qualquer um de seus tecidos, contém pouca ou nenhuma sacarose enquanto que

concentração de nutrientes no meio. A presença de altas concentrações de sacarose induz o desverdecimento, enquanto que a fertilização excessiva com nitrogênio (sob a forma de nitratos ou alguns aminoácidos como a L-serina) retarda esse processo. (HUFF, 1983; HUFF, 1984; IGLESIAS *et al*., 2001).

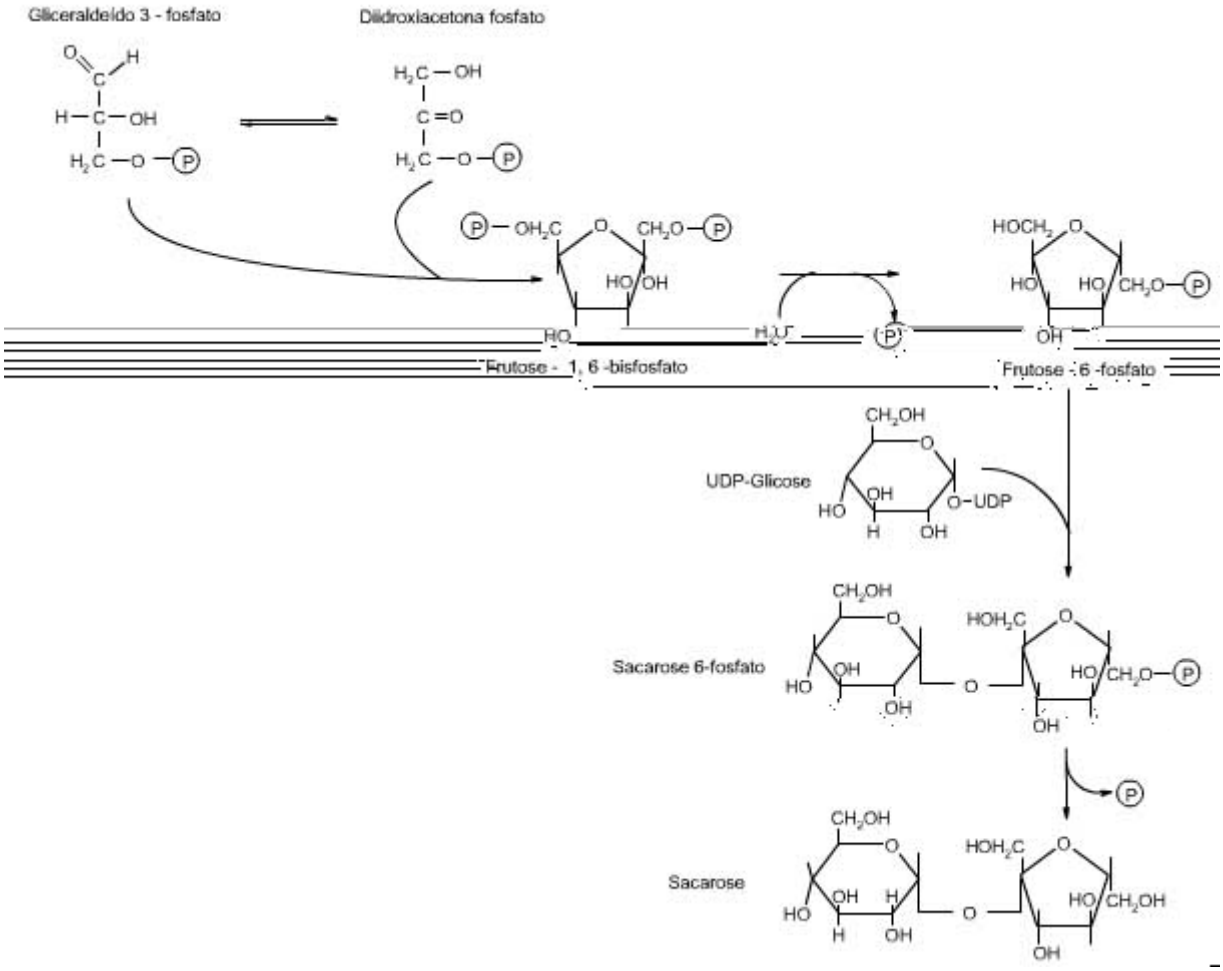


Figura 4. Síntese de sacarose na fase escura da fotossíntese.

Fonte: CHEMELLO, 2005.

2.2.6. Minerais

Os elementos traço são definidos como elementos minerais presentes em baixas concentrações (na ordem de mg/Kg, ou menos), nos solos, em plantas e outros organismos vivos. Vários desses elementos são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal de plantas, como o cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e boro (B). No caso dos animais, o cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), molibidênio (Mo), cobalto (Co) e selênio (Se) são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento adequados (PHIPPS, 1981; WEBBER, 1981 *Apud* HE, *et al*. 2005).

Processos desencadeados pelo homem, são fatores importantes para a entrada de elementos traço no ambiente. Alguns desses fatores são: o uso de fertilizantes, adubos orgânicos, despejos industriais, irrigação e depósitos secos e/ou molhados (HE, *et al*. 2005).

Apenas uma pequena parcela dos elementos traço presentes no solo é biodisponível. A mobilidade e disponibilidade destes elementos são controladas por diversos processos

químicos e bioquímicos como precipitação-solubilização, absorção-dessorção, complexação-dissociação e oxi-redução. Nem todos esses processos são igualmente importantes para cada elemento, mas todos eles são afetados pelo pH e a atividade biológica do solo (HE, *et al*. 2005).

O uso constante de fungicidas/pesticidas/herbicidas pode acarretar o aumento da concentração de minerais no solo. Segundo HE, *et al*. (2005) um exemplo claro disto é o aumento da concentração de cobre e zinco em solos onde foram cultivadas frutas cítricas.

GORINSTEIN *et al*. (2001) ao avaliarem os teores de ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e magnésio (Mg) em limão, laranja e pomelo descascados e em suas cascas, observaram que todos os minerais estavam presentes em maiores concentrações nas cascas dos frutos. Além disso, no limão tanto descascado quanto em sua casca, constataram que o Fe atingia concentrações extremamente superiores aos demais frutos (cerca de 530 e 620µg/100g, respectivamente); enquanto que nos demais frutos houve uma variação em torno de 10 a 130µg/100g.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Matéria – Prima

Foram utilizadas limas ácidas (*Citrus latifolia*, Tanaka.) da cultivar *Tahiti*, obtidas por plantio convencional e biodinâmico, ambas da safra de maio/junho de 2005. Foram adquiridos 19 Kg de lima ácida convencional no Mercado de Benfica no Rio de Janeiro, provenientes do estado de São Paulo. Dezoito quilos da lima ácida orgânica biodinâmica, certificada pelo Instituto Biodinâmico (IBD), foram fornecidos pela Fazenda Bom Jesus, localizada no município de Santa Rita do Passa Quatro, no estado de São Paulo (Latitude: 21graus, 43min/Longitude: 47graus, 29min).

No preparo do solo para o cultivo da lima ácida biodinâmica foi utilizado o formicida MACEX – isca, formicida granulado obtido de extratos de plantas da flora nativa brasileira, polpa de maçã e ácidos graxos orgânicos (atestado pelo I.P.T (SP) através do relatório de ensaio nº 881 789 de 06 de Julho de 2001), sendo um produto isento de toxicidade, estável a temperatura ambiente e ao ar e biodegradável, aprovado pela certificadora alemã de produtos orgânicos, BCS ÖKO-GARANTIE GMBH, por tratar-se de um insumo compatível com o regulamento ecológico da União Européia CEE 2092/91. A forma granulada foi utilizada por ser altamente atrativa e eficiente, pois as formigas transportam a isca para o interior do ninho, contaminando todo o formigueiro sendo também de fácil manejo para os trabalhadores. Produto específico, sendo o alvo somente formigas cortadeiras, não atingindo mamíferos, abelhas, peixes e outros insetos não alvo.

Os frutos foram codificados como: LC (lima ácida convencional) e LB lima ácida biodinâmica. Cada um dos grupos foi separado em 5 lotes com 10 unidades experimentais por lote, retiradas aleatoriamente. Desta forma, cada lote dos grupos experimentais LC e LB continham aproximadamente 3,8Kg e 3,6Kg de frutos, respectivamente.

2.3.2 Obtenção do Suco

Após a seleção dos frutos íntegros, sem injúrias, estes foram pesados e higienizados por imersão em água clorada a 100 ppm por 10 minutos, seguida de lavagem em água corrente para a remoção de resíduos. O suco foi extraído em multiprocessador doméstico e peneirado para que fosse retirada a polpa remanescente. O acondicionamento foi realizado em recipientes de PVC, e os sucos armazenados em freezer a –10°C.

2.3.3 Rendimento do Suco

O rendimento foi calculado pela diferença de peso entre os frutos inteiros e o peso final de suco obtido, para ambos os grupos experimentais (LC e LB).

2.3.4 Análises Físico-Químicas e Instrumentais

2.3.4.1 pH e acidez titulável total

As leituras de pH e as quantificações de acidez titulável total foram determinadas por titulação potenciométrica, em titulador automático (Metrohn 798MPT Titrino), de acordo com o método ISO (1998).

2.3.4.2 Sólidos solúveis totais (ºbrix)

O teor de sólidos solúveis totais (ºbrix) foi determinado através de leitura em refratômetro Atago TR 101, de acordo com o método ISO (1978).

2.3.4.3 Vitamina C (ácido ascórbico)

A concentração de ácido ascórbico foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo Alliance, coluna Bio rad HPX87H, detector UV/visível, fase móvel ácido sulfúrico 0,1N, com vazão de 0,7mL/min. O preparo da amostra foi realizado a partir de 2,5g de suco de lima ácida, diluído com ácido sulfúrico 0,1N e levado ao ultrasom por 10 minutos. Em balão volumétrico de 25 mL, o volume foi completado com ácido sulfúrico 0,1N e a solução filtrada em papel de filtro. A quantificação da vitamina C foi realizada a partir da injeção de uma solução padrão de ácido ascórbico na concentração de 20µg/mL.

2.3.4.4 Açúcares: glicose, frutose e sacarose

O preparo das amostras foi pesado 1,0g do suco de lima ácida. Após a adição de 5mL de água Milli Q a alíquota foi levada ao ultrasom por 20 minutos. Foram adicionados 5 mL de acetonitrila e o volume foi completado com água MilliQ em balão volumétrico de 25 mL. Seguiu-se a filtragem em papel de filtro e o acondicionamento em frascos de vidro. As amostras foram mantidas em freezer a -18°C, para posterior determinação. Os teores de frutose, glicose e sacarose foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo Alliance, coluna WAT 044355 de fase reversa grupamento amino, fase móvel 25:75 água Milli Q/acetonitrila, na vazão de 1 mL/ min, e detector de índice de refração W410. Foi utilizada uma solução padrão contendo 1,2g/25mL de cada um dos açúcares.

2.3.4.5 Minerais

As medidas foram realizadas na linha de Fluorescência de raios X (TXRF) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – São Paulo. O preparo das amostras foi realizado a partir de alíquotas de 500 mL de cada um dos sucos de lima ácida. As amostras foram colocadas em tubo digestor contendo ácido nítrico 65% (Merck) e 500 mL de H_2O_2 30% (Merck), para a digestão da matéria orgânica. A solução foi aquecida em estufa durante 6 horas a 60 ^{0}C, em tubo fechado. Em seguida, pipetou-se 500µL para eppendorf estéril e adicionou-se 50 µL de uma solução de gálio na concentração de 102 µg/g, como padrão interno. Desta solução, foram pipetados 8 µL para o centro de um suporte refletor de lucite, situado sob luz infravermelha, para desidratação da amostra.

Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Para verificação dos reagentes foram preparadas amostras com ácido nítrico e água oxigenada, também em triplicata. O resultado da medida dos brancos foi subtraído das medidas das amostras de suco de lima ácida. A amostra foi posicionada, horizontalmente ao detector de germânio hiperpuro (HPGe) – resolução de 140 eV em 5,9 keV, e excitada através de um feixe branco de irradiação de energia máxima igual a 20 keV, filtrado por 0,5 mm de alumínio com um ângulo de incidência de 1,0 mrad. O tempo de medida das amostras e dos padrões foi de 100 segundos e os espectros de raios X característicos obtidos foram analisados através do software Sistema de Análise Quantitativa de raios X (AXIL) [192], distribuído pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), obtendo as intensidades dos raios X para cada elemento, associado a uma incerteza.

2.3.5 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados no programa *Statistica* 5.1, pelo teste ANOVA. A comparação entre médias foi realizada pelo teste *Least Significative Diference* (LSD), em nível de 5% probabilidade.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Rendimento de Suco

O rendimento de suco da lima ácida cultivada pelo método convencional (LC) e da lima ácida biodinâmica (LB) foram de 56,0% (± 1,219) e 44,2% (± 3,434), respectivamente. Observa-se na Tabela 1 que o rendimento de suco do LC foi significativamente maior do que o do LB (p = 0,00009). Como o percentual de cascas do fruto orgânico biodinâmico foi significativamente maior do que o dos frutos convencionais (LC 40,63 % ± 2,305 e LB 49,16 % ± 2,701; p = 0,0007), isto pode ter colaborado substancialmente para a diminuição do rendimento de suco nos frutos LB.

Tabela 1. Rendimento dos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica.

Amostras	Rendimento (%)	Cascas (%)
LC	56,02 [a] (± 1,219)	40,63 [b] (± 2,305)
LB	44,20 [b] (± 3,434)	49,16 [a] (± 2,701)

a, b. Letras diferentes representam diferença significativa. p<0,001.

Em frutos cítricos, este tipo de variação da proporção entre a espessura da casca e a quantidade de suco obtido, pode ser influenciada pelo nível de fertilizantes utilizados. Segundo CHITARRA & CHITARRA (1990), a aplicação de potássio, magnésio e zinco aumentaria o tamanho e o peso dos frutos, enquanto que a aplicação de nitrogênio e fósforo os reduziria. Além disso, a deficiência de fósforo e potássio poderia levar a formação de casca muito espessa.

O estádio de maturação dos frutos também pode influenciar em seu rendimento de suco. ZIENA (2000) observou que limas ácidas verdes apresentavam 55,6% de rendimento, enquanto que em frutos de casca amarelo-esverdeada este valor era de 59,4%. Observou-se que o rendimento de suco de LC, foi muito semelhante ao descrito acima, por ZIENA (2000), para as lima ácidas verdes. Isto é coerente, visto que os frutos utilizados no presente trabalho apresentavam-se no estádio verde de maturação, que é o de maior valor comercial. Segundo o site especializado TODA FRUTA (2003), o rendimento de suco esperado dos frutos de lima ácida Tahiti, é em torno de 50%. Em vista do exposto acima, pode-se supor que ao menos na safra avaliada, a lima ácida biodinâmica realmente apresentou rendimeto reduzido em relação ao esperado pela literatura.

Fatores que podem ter acarretado o aumento da espessura da casca, e a consequente redução do percentual de suco são: concentrações altas de nitrogênio e potássio e, variações na umidade relativa e na temperatura do ambiente (CHITARRA & CHITARRA, 1990). O aumento da salinidade também foi descrito por GARCÍA-SANCHEZ *et al.* (2003) como um fator importante para a redução do rendimento de suco de limão *Fino 49* (*Citrus Macrophylla*, Wester). Contrariamente, os autores relatam que com o aumento da quantidade de água de irrigação, o efeito inverso foi observado.

Portanto, constatou-se que a lima ácida orgânica biodinâmica apresentou um rendimento de suco reduzido e um percentual de cascas aumentado, quando comparada ao fruto convencional. Isto pode ter sido decorrente dos diferentes métodos de cultivo, visto que, segundo os autores citados acima, estes parâmetros podem ser alterados por diversos fatores como fertilizantes, irrigação, umidade relativa, temperatura e estádio de maturação.

2.4.2 Sólidos Solúveis, Acidez Titulável e pH

Os resultados obtidos para acidez (LC 6,05 e LB 5,98; p = 0,804), pH (LC 2,81 e LB 2,78; p = 0,180) não apresentaram diferença significativa entre os grupos (p>0,05) (Tabela 2).

Tabela 2. Sólidos solúveis, pH, acidez e vitamina Cdos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica.

Amostras	pH	Acidez (g/100g ácido cítrico)	Sólidos Solúveis (°Brix)	Vitamina C (mg/100g)
LC	2,81 [a] (± 0,011)	6,05 [a] (± 0,157)	8,42 [a] (± 0,189)	22,86 [a] (± 0,426)
LB	2,78 [a] (± 0,044)	5,98 [a] (± 0,502)	7,63 [b] (± 0,379)	22,80 [a] (± 2,084)

a, b. Letras diferentes representam diferença significativa. p<0,05.

Observou-se que os valores referentes à acidez titulável total de ambos os grupos apresentaram-se dentro do esperado segundo o Padrão de Identidade e Qualidade do MAPA (BRASIL, 2000), que determina o mínimo de 5g/100g de ácido cítrico. Além disso, estiveram coerentes com o descrito pelo *site* especializado, TODA FRUTA (2003), que referencia uma média de 5 a 6 g/100g de ácidez em ácido cítrico para suco de lima ácida *Tahiti*.

Em relação ao teor de sólidos solúveis, o grupo LC (8,42 ± 0,189) apresentou concenrações significativamente maiores do que o do grupo LB (7,63 ± 0,379; p = 0,033) (p<0,05). Esta diferença quanto ao °Brix poderia acarretar por exemplo, uma diferenciação entre as características sensoriais dos sucos. Diversos autores citam a importância da proporção entre açúcares e ácidos orgânicos, expressa pela razão °Brix/acidez, que pode afetar características químicas e sensoriais dos alimentos. Com isso, fornecem informações fundamentais para a avaliação da segurança, a otimização de processos tecnológicos e da aceitação do consumidor (MATTHEIS *et al*., 1999; CHINNICI *et al*., 2005; MARSH *et al*., 2006).

Esta diversidade na composição dos frutos pode ser acarretada por diferenças na intensidade da luz solar e pelo uso de pesticidas (MATTHEIS *et al*., 1999). Os frutos expostos ao sol podem apresentar maior teor de sólidos solúveis e menor acidez, enquanto que a fertilização com fósforo leva a uma redução da acidez total e do teor de sólidos solúveis (CHITARRA & CHITARRA, 1990).

ZIENA (2000) apontou que o valor de pH de suco de lima fresco extraído de frutos com grau de maturação mais adiantado foi menor do que o encontrado no suco dos frutos verdes. Em contraste, os valores de °Brix e acidez aumentam ao longo do amadurecimento. Os valores encontrados pelo autor para pH (2,62), acidez (6,33%) e °Brix (9,48), no fruto verde se assemelham mais aos descritos no presente trabalho, do que os valores reportados para frutos mais maduros. Esta semelhança é coerente, visto que os frutos utilizados na realização deste trabalho estavam no estádio verde de maturação. Cabe ressaltar que para ser comercializada como “limão Tahiti” as limas ácidas devem estar ainda verdes, perdendo seu valor comercial ao amadurecerem.

Estes resultados foram semelhantes aos observados por MARÍN *et al.* (2002) ao avaliarem sucos de limão das variedades *Fino* e *Verna* obtidos em processo não industrial (manual), por prensagem e filtração em tela de nylon. Seus resultados variaram entre 7,70 a 5,53g/100mL para acidez e de 9,0 a 6,5g/100mL para sólidos solúveis. Houve semelhança ainda com o

trabalho de PEDRÃO *et al.* (1999) que avaliaram os teores de ácido cítrico, sólidos solúveis e pH em sucos obtidos a partir de lima ácida cv. *Tahiti*, a serem adoçados para a obtenção de limonada; 5,56g/100mL; 8,9 e 2,75, respectivamente.

2.4.3 Vitamina C (Ácido Ascórbico)

Nos resultados apresentados na Tabela 2 observa-se que a concentração de ácido ascórbico nos sucos LC e LB (22,86 ± 0,426 e 22,80 ± 2,084, respectivamente; p = 0,960) não diferiram significativamente entre si (p>0,05). O ácido L-ascórbico é a principal forma ativa da vitamina C, e é reversivelmente oxidado a ácido deidroascórbico, que também possui atividade biológica (ARANHA *et al*., 2000). Os cromatogramas correspondentes ao padrão de ácido ascórbico e às concentrações deste nos sucos de lima ácida convencional e biodinâmica estão demonstrados na Figura 5.

Estes resultados estão de acordo com Padrão de Identidade e Qualidade do MAPA (BRASIL, 2000), que determina o mínimo de 20,0 mg/100g para ácido ascórbico em suco de limão. Quando comparados aos dados do USDA (2005), que reportam 30,0 mg/100g de vitamina C em suco de lima integral, as concentrações encontradas mostram-se discretamente menores. Diversas tabelas de composição de alimentos descrevem a concentração de vitamina C de suco de limão. Segundo a Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (PINHEIRO *et al*., 2001), 100 mL de uma limonada preparada com 6 mL de suco de limão contém 4,74 mg de vitamina C. Portanto, calcula-se que em cada 100mL do suco utilizado haveria 79mg da vitamina. Esta concentração coincide com a descrita na Tabela de Composição de Alimentos (FRANCO, 2002), de 79mg/100g de suco de limão fresco. A Tabela de Composição elaborada pelo Estudo Nacional de Despesa Familiar (IBGE, 1999), aponta 51mg/100g da parte comestível de limão (*Citrus limon*, L. Burn.). Enquanto que PHILIPPI (2001), na "Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para Decisão Nutricional", reporta a concentração de vitamina C em 46mg/100g. Já a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (NEPA-UNICAMP, 2006), reporta 38,2mg de vitamina C em 100g da parte comestível de limão *Tahiti* cru.

Nestas Tabelas observa-se uma grande discrepância entre os valores, de modo que torna-se imprecisa a comparação com os dados obtidos neste trabalho. Entretanto há uma semelhança maior entre estes dados e o descrito pela Tabela mais atual, a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da UNICAMP. Provavelmente, isto pode ser atribuido a semelhanças entre as condições geográficas e de cultivo. Um fator importante que dificulta a comparação entre os dados é que normalmente as tabelas não descrevem a variedade do fruto estudado. As Tabelas da NEPA-UNICAMP (2006) e do IBGE (1999) foram as que disponibilizaram estas informações.

O ácido ascórbico é amplamente distribuído nas células vegetais e tem papel crucial em seu crescimento e metabolismo (HERNANDÉZ *et al*., 2006), podendo ser sintetizado a partir de açúcares fornecidos através da fotossíntese (LEE & KADER, 2000). Desta forma os sucos de fruta, especialmente os cítricos, são importante fonte dietética de ácido ascórbico para humanos e demais mamíferos incapazes de sintetizá-lo. (KABASAKALIS *et al*., 2000; VALPUESTA & BOTELLA, 2004). Segundo LEE & KADER (2000), em frutos cítricos, a concentração de vitamina C diminui com o amadurecimento, entretanto o conteúdo por fruto maduro é maior do que nos frutos verdes, devido ao aumento do volume de suco e do tamanho do fruto. As limas analisadas no presente trabalho estavam no estádio verde de maturação, que é o adequado para a comercialização destas como "limão" *Tahiti*.

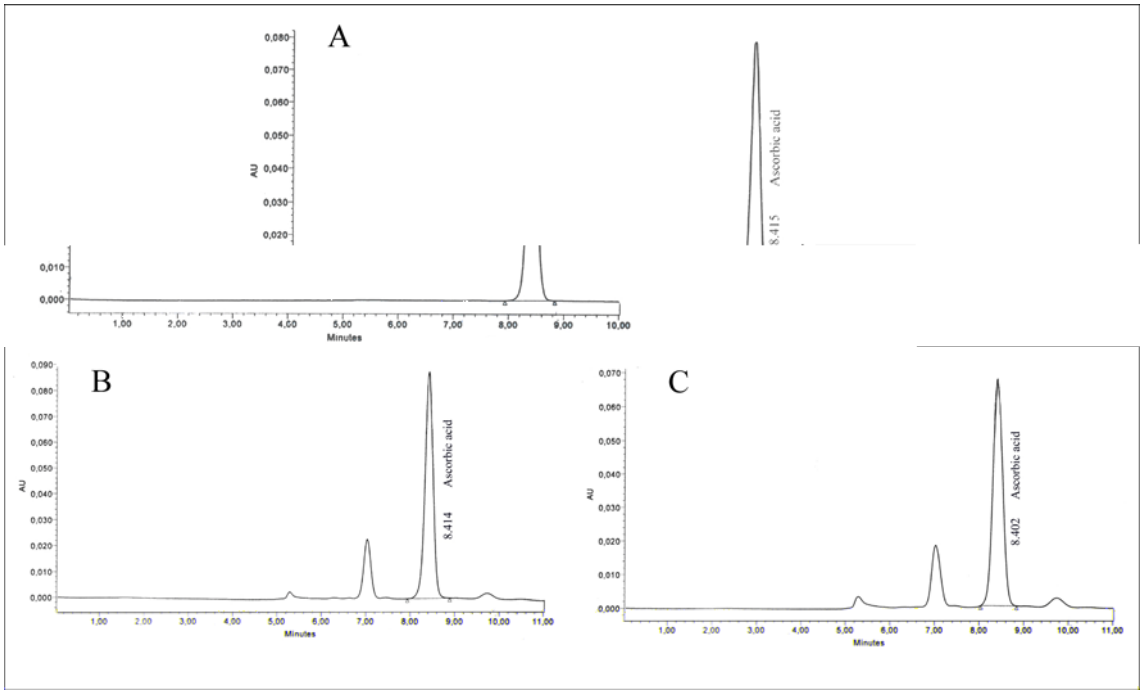


Figura 5. Padrão de ácido ascórbico (A), suco de lima ácida convencional (B) e suco de lima ácida biodinâmica (C).

O conteúdo de vitamina C em frutas e vegetais pode ser influenciado por diversos fatores, como: diferenças genotípicas, condições climáticas pré-colheita, práticas de cultivo, maturidade, métodos de colheita e manipulação pós-colheita (LEE & KADER, 2000). Isto pode ser explicado por uma rede metabólica complexa, envolvendo a biossíntese, o catabolismo e a reciclagem do ácido ascórbico (LORENCE, 1999; VALPUESTA & BOTELLA, 2004). De acordo com LEE & KADER (2000), fatores como o aumento da intensidade da luz durante a fase de crescimento, a redução da freqüência de irrigação e o aumento da fertilização com potássio, poderiam acarretar a elevação do teor de vitamina C nos frutos. Além disso, este aumento na concentração de vitamina C poderia atuar também como uma estratégia de proteção à injúria provocada pela escassez de água. Já a fertilização com altas concentrações de nitrogênio tenderia a reduzir a concentração da vitamina C.

MURILLAS RUIZ *et al*., (2005) observaram que cultivos ecológicos de tangerinas e limões apresentavam maior capacidade antioxidante e maior concentração de vitamina C do que os frutos obtidos pelos métodos convencionais de cultivo. Porém, o oposto foi observado em laranjas, sendo as convencionais mais ricas em vitamina C do que as ecológicas. BORGUINI & SILVA (2007) não encontraram diferença significativa na concentração de ácido ascórbico, quando avaliaram tomates da variedade Carmen, cultivados orgânica ou convencionalmente. Entretanto, em tomates da variedade Débora, os autores observaram que os cultivados pelo método convencional apresentavam teores mais elevados de ácido ascórbico do que os orgânicos. Desta forma, não foi identificado um padrão de comportamento que permita prever alterações nos teores de ácido ascórbico quando utlizados cultivos convencionais ou agroecológicos.

2.4.4 Açúcares (Frutose, Glicose e Sacarose)

As concentrações de frutose foram significativamente maiores ($p<0,01$) nos frutos convencionais (LC 0,98 e LB 0,66 g/100g; $p = 0,009$). O mesmo ocorreu em relação a glicose (LC 0,89 e LB 0,54 g/100g; $p = 0,001$). Quanto a sacarose, não houve diferença

significativa (p = 0,185) dentre os grupos (LC 0,07 e LB 0,12 g/100g). Os resultados e os cromatogramas correspondentes estão descritos na Tabela 3 e na Figura 6.

Tabela 3. Concentração de glicose, frutose e sacarose em suco de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica.

Amostras	Frutose (g/100g)	Glicose (g/100g)	Sacarose (g/100g)
LC	0,98 (± 0,100) [a]	0,89 (± 0,051) [a]	0,07 (± 0,058) [a]
LB	0,66 (± 0,058) [b]	0,54 (± 0,053) [b]	0,12 (± 0,021) [a]

a, b. Letras diferentes representam diferença significativa. p<0,05.

Segundo o USDA (2005), os teores de frutose, glicose e sacarose em suco de lima integral estariam em torno de 0,61, 0,60 e 0,48 g/100g, respectivamente. Dentre os dados descritos no presente trabalho os teores de frutose e glicose, da lima ácida biodinâmica (LB), foram os que mais se assemelharam aos do USDA. Adicionalmente, quando comparados aos resultados de HULME (1970) (frutose 1,35 g/100mL, glicose 1,40 g/100mL e sacarose 0,41g/100mL) não houveram semelhanças entre os resultados. Isto pode ser justificado pelo fato de se tratarem de frutos cultivados em ambientes muito distintos, podendo haver diferenças entre variedades, métodos de cultivo e estádio de maturação dos frutos estudados ou nos métodos de análise empregados.

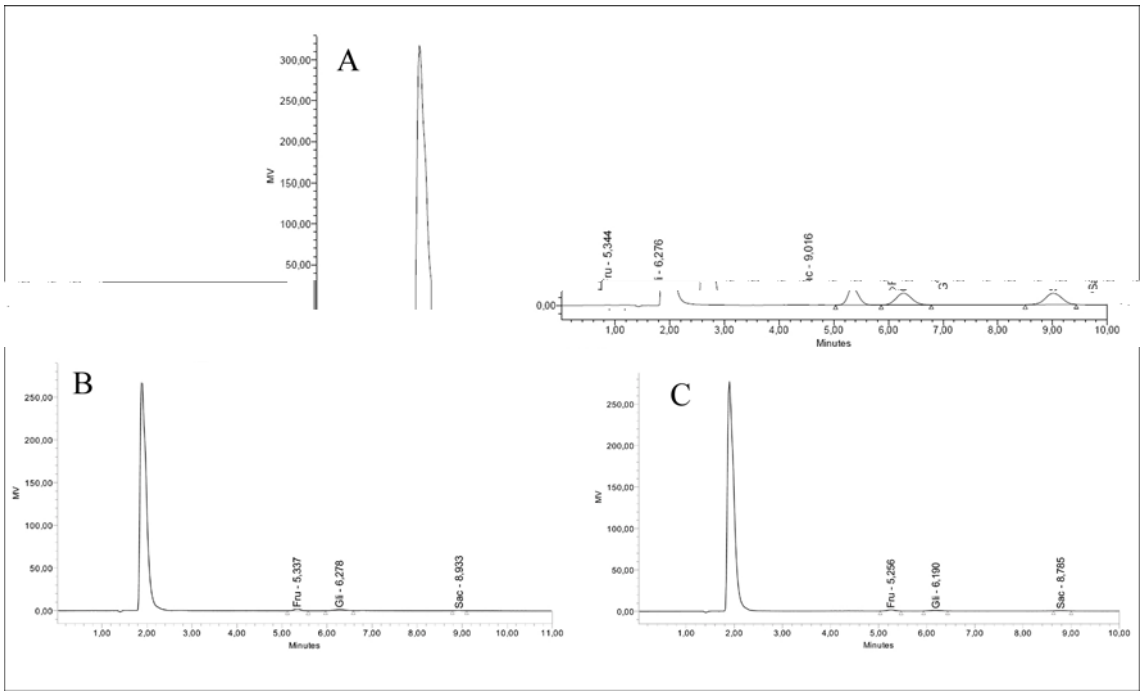


Figura 6. Padrão de frutose, glicose e sacarose (A), suco integral de lima ácida convencional (B) e suco de lima ácida biodinâmica (C).

As concentrações de frutose e glicose encontradas no suco orgânico biodinâmico, justificam o °Brix reduzido. Este é um resultado coerente, visto que estes açúcares têm papel importante na composição de sólidos solúveis do suco de lima e, portanto, quando encontram-se em quantidades reduzidas, a leitura do °Brix tende a ser menor.

2.4.5 Minerais

Os resultados obtidos quanto ao teor de minerais no suco dos grupos LC e LB estão descritos na Tabela 4. Não houveram diferenças significativas entre os grupos, quanto as concentrações de cálcio (Ca) e zinco (Zn) (LC 23,24 e LB 23,41µg/g p = 0,852; LC 0,29 e LB 0,43µg/g p = 0,088, respectivamente). Entretanto, o suco de lima convencional apresentou teores mais elevados de potássio (K) (LC 376,79 e LB 240,70µg/g p = 0,036), manganês (Mn) (LC 0,08 e LB 0,04µg/g p = 0,006), ferro (Fe) (LC 1,71 e LB 0,75µg/g p = 0,013) e cobre (Cu) (LC 0,35 e LB 0,20µg/g p = 0,005).

Tabela 4. Minerais nos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica.

	LC (µg/g)	**LB** (µg/g)
K	376,79 ± 33,270 [a]	240,70 ± 17,112 [b]
Ca	23,24 ± 0,693 [a]	23,41 ± 0,856 [a]
Mn	0,08 ± 0,004 [a]	0,04 ± 0,000 [b]
Fe	1,71 ± 0,078 [a]	0,75 ± 0,134 [b]
Cu	0,35 ± 0,014 [a]	0,20 ± 0,007 [b]
Zn	0,29 ± 0,064 [a]	0,43 ± 0,014 [a]

a, b. Letras diferentes representam diferença significativa. p<0,05.

As diferenças encontradas entre os grupos podem ter diversas causas. Uma delas pode ser a utilização de fungicidas/pesticidas/herbicidas pelo cultivo convencional, o que levaria ao aumento da concentração de minerais no solo, acarretando maiores teores desses nutrientes nos frutos. Isto vai de encontro ao descrito por HE, *et al*. (2005), que cita o aumento da concentração de cobre e zinco em solos onde foram cultivadas frutas cítricas. Cabe ressaltar que, o cobre foi encontrado em maiores concentrações nos frutos convencionais, enquanto que o zinco foi significativamente mais abundante em frutos biodinâmicos. Isto aponta para a constatação de que os diferentes métodos de cultivo influíram nos teores finais de minerais nos frutos. Este tipo de processo de incorporação de minerais no ambiente pode ser provocado por diversos fatores, como a utilização freqüente de fertilizantes e adubos orgânicos, despejos industriais, irrigação, dentre outros (HE, *et al*., 2005).

Além disso, fatores como o pH e a atividade biológica do solo afetam os diversos processos químicos e bioquímicos que determinam a biodisponibilidade dos minerais para as plantas. Esses processos (precipitação-solubilização, absorção-dessorção, complexação-dissociação e oxi-redução), não são igualmente importantes para cada elemento, e desta forma uma rede complexa de fatores pode afetar os teores finais de um determinado mineral nos frutos (HE, *et al*., 2005).

Outro importante fator que pode estar envolvido, é a distribuição dos minerais no fruto. GORINSTEIN *et al*. (2001) ao avaliarem os teores de ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e magnésio (Mg) em limão, laranja e pomelo descascados e em suas cascas, observaram que todos os minerais estavam presentes em maiores concentrações nas cascas dos frutos. Considerando-se que as limas biodinâmicas apresentaram um percentual de cascas significativamente maior do que as convencionais, pode-se cogitar a possibilidade de os minerais que se encontram mais abundantes do suco dos frutos convencionais, estejam em maiores concentrações nas cascas dos frutos biodinâmicos.

PHILIPPI (2001), na “Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para Decisão Nutricional” descreve a composição de minerais em 100g de suco de limão como: 124mg de K, 1,0mg de Na, 6,0mg de P, 7,0mg de Ca, 0,03mg de Fe, 6,0mg de Mg, 0,03mg de Cu, 0,05mg de Zn, 0,01mg de Mn e 0,2µg de Se. Na Tabela de Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (PINHEIRO *et al*., 2001), em 100ml de suco de limão estima-se 23mg

de Ca e 0,83mg de Fe. Já na Tabela de Composição elaborada pelo Estudo nacional de Despesa Familiar (IBGE, 1999), a concentração de Ca, P e Fe em limão é de 41mg/100g, 15mg/100g e 0,7mg/100g. Em FRANCO (2002) os teores de minerais em 100g de limão foram 16mg de Mg, 0,03mg de Mn, 11mg de S, 0,19mg de Cu, 0,17mg de Zn e 0,1µg de I. A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (NEPA-UNICAMP, 2006) reporta que em 100g da parte comestível de limão *Tahiti* cru, há 51mg de Ca, 10mg de Mg, 0,07mg de Mn, 24mg de P, 1,0mg de Na, 128mg de K, 0,06mg de Cu e 0,2mg de Zn,. O USDA (2005) reporta, para suco de lima integral, concentrações de Ca, Fe, Mg, P, K, Na, Zn, Cu, Mn e Se. Estes teores, em mg/100g, são respectivamente: 33, 0,60, 6,0, 18, 102, 2,0, 0,11, 0,06, 0,008, e 0,4(mcg/100g).

Quando comparados os resultados obtidos com os descritos pelas referidas tabelas, observa-se que, nenhum dos resultados esteve de acordo com PHILIPPI (2001). PINHEIRO *et al.* (2001) reportaram resultados semelhantes para cálcio e ferro, e na tabela IBGE (1999) os teores de ferro também se assemelham aos apresentados neste trabalho. Ainda em relação ao ferro, observa-se que apenas os resultados do grupo LB são semelhantes aos do USDA (2005). Da mesma maneira, apenas a concentração de cobre do grupo LB coincide com a tabela de FRANCO (2002), assim como o magnésio. E por fim, os teores de magnésio e zinco do grupo LC foram bastante similares aos descritos pela tabela NEPA-UNICAMP (2006). Cabe destacar que as concentrações de potássio relatadas neste trabalho, foram mais elevadas do que as descritas em todas as tabelas consultadas.

A utilização de cultivares e/ou variedades diferentes de limão, a utilização de suco do limão em alguns casos e do fruto *in natura* em outros, a composição mineral do solo onde cada fruto foi cultivado são algumas das explicações prováveis para a grande variação dentre os teores reportados nas diferentes tabelas.

Em relação aos valores de Ingestão Dietética Recomendada (DRIs) para adultos, a contribuição percentual dos teores de K, Ca, Mn e Fe em 100g de suco variaram entre 0,2% e 0,9%. As contribuições mais significativas foram para Cu e Zn. Estes valores foram, em LC e LB, respectivamente de 3,9% e 2,3% para Cu e 2,6% e 3,9% para Zn. Portanto, pode-se observar que o cobre e o zinco seriam os minerais de maior relevância nutricional, em ambos os sucos.

2.5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que, em relação aos parâmetros acidez titulável total, pH, ácido ascórbico, sacarose, cálcio e zinco, não houveram diferenças significativas entre o suco de lima ácida *Tahiti* proveniente de cultivo biodinâmico e convencional. Isto indica que as diferenças empregadas nos dois métodos de produção; convencional e orgânico biodinâmico; não interfeririam no conteúdo deste nutrientes no produto final.

Entretanto, alguns nutrientes mostraram-se mais sensíveis a estas variações, encontrando-se em quantidades distintas quando comparados os frutos convencionais e orgânico biodinâmicos da safra de maio/junho de 2005. No fruto orgânico biodinâmico, o rendimento de suco, os teores de sólidos solúveis totais, frutose, glicose, potássio, manganês, ferro e cobre foram significativamente menores quando comparados ao convencional.

Cabe ressaltar que ambos os frutos são provenientes da mesma região, localizada no Estado de São Paulo. Desta forma observa-se que podem haver distinções entre os sucos de limas ácidas provenientes de cultivo convencional e orgânico biodinâmico, e que estas variações provavelmente decorrem das diferenças no manejo de cada plantio.

Entretanto, a lima ácida biodinâmica apresenta um potencial interessante para a produção de suco, visto que é uma matéria prima obtida por plantio isento de agrotóxicos, fator determinante para um crescente número de consumidores.

CAPÍTULO II

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUCO DE LIMA ÁCIDA *(Citrus latifolia*, TANAKA.) CV. TAHITI, CONVENCIONAL E BIODINÂMICA.

RESUMO

A hidrólise enzimática em suco de fruta é um tratamento prévio ao processo de clarificação por membranas. Portanto, para a clarificação de suco de lima ácida orgânica biodinâmica, faz-se necessário avaliar as condições ideais de hidrólise para esta matéria prima. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a hidrólise enzimática de sucos obtidos de limas ácidas cv. *Tahiti* convencional (LC) e orgânica biodinâmica (LB). A matéria-prima foi selecionada, pesada e higienizada e o suco foi extraído, peneirado, acondicionado em recipientes de PVC e armazenado em freezer a –10°C. Foram utilizadas três diferentes preparações enzimáticas: Citrozym ultra L®, Citrozym cloudy® 100L e Pectinex®. As condições de hidrólise foram selecionadas utilizando-se os valores máximo, mínimo e médio dos tempos de incubação e a concentração de cada enzima. Desta forma, houveram 5 tratamentos diferentes, considerando a concentração da enzima e o tempo de incubação: 0,07% por 20 minutos, 0,07% por 60 minutos, 0,3% por 20 minutos, 0,3% por 60 minutos e 0,2% por 40 minutos. A determinação do tamanho de partículas foi realizada pelo método ótico de difração e reflexão com raio laser. Os teores de frutose, glicose e sacarose foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os dados foram analisados no programa *Statistica* 5.1, pela análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste *Least Significance Difference* (LSD) em nível de 5% probabilidade. Conclui-se que para as enzimas Citrozym cloudy® e Pectinex®, a condição ideal de hidrólise, tendo como base a redução do tamanho de partículas, é a 0,3/60 tanto para LC quanto para LB. Para a Citrozym cloudy®, observou-se que a condição 0,3/60 acarretaria a redução da concentração de glicose, apenas no LC; enquanto que nestas mesmas condições a Pectinex® levaria a um aumento nos teores de sacarose, em ambos os sucos. No caso da Pectinex®, as condições de 0,2/40 (para LC) e 0,3/20 (para LB) também se mostraram eficazes na redução de tamanho de partículas, sem ocasionarem alterações no teor de açúcares. A Citrozym ultra® poderia ser aplicada a ambos os sucos, na condição de 0,2/40, com resultados satisfatórios, acarretando a elevação do teor de glicose no suco LC.

Palavras chave: hidrólise enzimática, *Citrus latifolia*, tamanho de partículas, açúcares.

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis in fruit juice is a previous treatment, applied when membranes clarification process will be used. Therefore, is necessary to determinate the ideal hydrolysis condition for each raw material. The present work had as objective to optimize the enzymatic hydrolysis of acid lime juice, cv. *Tahiti* cultivated by conventional (CL) and biodynamic (BL) methods. The raw material was selected, weighted, higienized, and the juice was extracted, bottled, conditioned in identified PVC containers and stored under freezing at -10°C. Three enzymatic preparations were used: Citrozym ultra® L, Citrozym cloudy® 100L e Pectinex®. The hydrolysis conditions were carried out using the highest, the medium and the least values for incubation time and enzymatic concentration. This way, there were 5 different treatments: 0.07% during 20 and 60 minutes, 0.3% during 20 and 60 minutes and 0.2% during 40 minutes. The particles size were analyzed by the laser optical method and the fructose, glucose and sucrose was analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The statistical analysis applied was the analysis of variance (ANOVA) and the comparison among the averages of treatments was accomplished by the Least Significance Difference (LSD) test at the level of 5% of probability. The great analysis conditions for Citrozym cloudy® and Pectinex® were 0.3/60, in CL and BL. However, the glucose contend reduces in CL, if uses Citrozym cloudy® at these conditions. Using Pectinex®, at these same conditions, sucrose contends increases, in both groups. The 0.2/40 (for CL) and 0.3/20 (for BL), with Pectinex®, could reduced the particles size without change sugars contends. In addiction, Citrozym ultra® could be used at 0.2/40 condition, resulting in a satisfactory particle size reduction, increasing the glucose contend.

Keywords: enzymatic hydrolysis, *Citrus latifolia*, particles size, sugars.

3.1 INTRODUÇÃO

O aumento na demanda por produtos processados cujos nutrientes sejam preservados, acarretou o desenvolvimento de processos alternativos ao tratamento térmico, como por exemplo, os processos de filtração por membranas. Estes processos, como a microfiltração e ultrafiltração, podem ser aplicados a sucos de fruta, obtendo-se a esterilidade comercial a frio, além da manutenção do valor nutricional e das características sensoriais do produto de acordo com o diâmetro de poro da membrana utilizada, entre outros fatores. Entretanto, estes processos têm como fatores limitantes a redução do fluxo de suco permeado, a compactação de sólidos na superfície (polarização de concentração) ou penetração de sólidos nos poros das membranas (*fouling*) os quais podem inviabilizar o processo. A fim de minimizar estes fenômenos, a literatura sugere a realização da hidrólise enzimática prévia a estes processos. Desta forma, pode-se reduzir o tamanho de partículas do suco, minimizando estes fenômenos (LEE *et al*., 2006; KLAHORST, 2003; NOVOZYMES, 1993).

Portanto, este capítulo teve como objetivo otimizar a hidrólise enzimática de sucos obtidos de frutos de lima ácida cv. *Tahiti* cultivados pelos métodos convencional e orgânico biodinâmico; para posterior aplicação em processos com membranas. Para tanto, avaliou-se o tamanho de partículas e os teores de frutose, glicose e sacarose, nos sucos hidrolisados com as enzimas comerciais Citrozym cloudy®® 100L, Citrozym ultra® L e Pectinex®, em diferentes concentrações e tempos de incubação.

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.2.1 Celulose, Hemicelulose e Pectinas

A celulose é um polímero não-ramificado constituído de 100 a 200 unidades de D-glucopiranose, ligadas em β(1-4), de difícil hidrólise; a não se por ação enzimática (celulases). Constitui a parede celular dos vegetais superiores, sendo o composto mais importante da sua estrutura. Na dieta humana, faz parte das fibras dietéticas insolúveis, ou seja, não é degradada nem absorvida pelo trato digestivo humano. Assim como a celulose, a hemicelulose é um polissacarídeo encontrado na parede celular de células vegetais. Entretanto, é uma molécula muito menor, constituída principalmente por unidades de D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e L-ramnose (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

As pectinas são polissacarídeos ácidos formadas, principalmente, por unidades de ácido galacturônico. O ácido D-galacturônico é um monossacarídeo derivado da D-galactose, onde o grupo hidroxílico primário está oxidado a carboxílico. São substâncias coloidais, solúveis em água e possuem graus de neutralização e de metoxilação variáveis (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Juntamente com a celulose e a hemicelulose, as pectinas constituem a parede celular das plantas superiores (YAPO *et al*., 2007); localizando-se, especialmente, em tecidos pouco rígidos, como o albedo de frutas cítricas. Pode haver açúcares neutros, como D-galactose, L-arabinose e L-ramnose, ligados aos resíduos de ácido galacturônico (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Isto torna sua estrutura extremamente complexa e heterogênea, podendo-se distinguir regiões denominadas homogalacturanas e das ramnogalacturanas. A região homogalacturana, consiste em resíduos de ácido D-galacturônico, ligados em α(1,4). As ramnogalacturanas I são caracterizadas por trechos que alternam os resíduos de ácido D-galacturônico com a L-ramnose (THIBAULT *et al*., 1996). Há ainda as ramnogalacturanas II, que são moléculas de baixo peso molecular e, altamente complexas. Sua cadeia principal é composta de, pelo menos, oito unidades de ácido D-galacturônico (α(1,4)) para cada quatro ramificações. Estas podem ser formadas por até doze tipos de monossacarídeos diferentes, incluindo o ácido galacturônico, e açúcares pouco usuais, como apiose, 2-O-metil-fucose, ácido 2-O-metil-xilose, 3-C-carboxil-5-deoxi-L-xilose (ácido acerico), ácido 2-ceto-3-dioxi-D-manno-octulosonico (Kdo) e ácido 3-dioxi-D-lixo-heptulosarico (Dha) (VIDAL *et al*., 2000).

ZHAN *et al*. (1998) propuseram que as pectinas comerciais provenientes de frutos cítricos eram compostas, predominantemente, de regiões de homogalacturanas, com cerca de 60 a 70% de metoxilação. E, além disso, haveriam regiões de ramnogalacturanas I, com uma cadeia principal composta de unidades repetidas do dissacarídeo GalA-Rha (ácido galacturônico e ramnose), e cadeias laterais compostas de açúcares neutros. Estes açúcares, segundo YAPO *et al*. (2007), seriam, principalmente, arabinose, galactose, ácido galacturônico e ramnose, o que sugere a presença de cadeias laterais compostas de arabinanas e/ou (arabino) galactanas. A razão molar entre o ácido galacturônico e a ramnose, em pectina extraída da casca de frutos cítricos, foi de 1:1, o que indica uma repetição contínua de GalA-Rha (ácido galacturônico e ramnose). Desta forma, YAPO *et al*. (2007), concluíram que as pectinas dos frutos cítricos consistem, predominantemente, de homogalacturanas, com poucas frações de ramnogalacturanas I e traços de ramnogalacturanas II.

As pectinas, quando em solução aquosa, podem tornar o meio altamente viscoso, mesmo quando em baixas concentrações, dependendo do seu grau de metoxilação. Na presença de sacarose e em meio ácido, e em condições ideais, são capazes de formar géis muito estáveis (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Esta capacidade de formação de géis pode ser benéfica ou não no processamento de frutas. Apesar de ser uma característica essencial na

produção de recheios e geléias de frutas, pode ser um problema quando o objetivo é produzir sucos de frutas clarificados (KLAHORST, 2003).

3.2.2 Hidrólise Enzimática em Sucos de Fruta

O tratamento enzimático de sucos de fruta, através da utilização de pectinase, tem sido utilizado em diferentes matérias-primas. A presença de macromoléculas, como aquelas de pectina, interfere nos processos de clarificação com membranas, como a ultrafiltração e a microfiltração, acarretando o entupimento da membrana ou de seus poros e, conseqüentemente, o declínio no fluxo de permeado. A pectinase hidrolisa a pectina, levando a floculação de complexos pectina-proteína, resultando em sucos com reduzido teor de macromoléculas. Desta forma, a viscosidade do suco é reduzida, facilitando o processo de clarificação (LEE, *et al*., 2006).

As preparações enzimáticas possibilitam a redução dos custos de processamento de sucos através do aumento do rendimento e da taxa de filtração, e melhorando o processo de clarificação. Na redução da viscosidade do suco, a aplicação de enzimas tem por objetivos evitar a geleificação, facilitar a concentração e proporcionar estabilidade à turvação. Na clarificação de sucos, a hidrólise colabora na despectinização, tornando a filtração mais fácil, resultando em um suco concentrado mais estável e com pouca ou nenhuma pectina residual. O processo de hidrólise enzimática pode ser afetado por variáveis como, a concentração da enzima, a temperatura e o tempo de incubação. (NOVOZYMES, 1993; LEE *et al*., 2006).

LEE *et al*. (2006) avaliaram as condições de hidrólise ideais para suco de banana, utilizando preparações enzimáticas comerciais pectinolíticas e amilolíticas (Pectinex® Ultra SP-L e AMG 300L, respectivamente). Constataram que a filtrabilidade, a clarificação, a viscosidade e a turbidez estavam significativamente correlacionadas à concentração enzimática e a temperatura e tempo de incubação.

O termo pectinase refere-se a uma mistura específica de enzimas capazes de degradar tanto a cadeia principal quanto as cadeias laterais da pectina. Três enzimas têm ações complementares para a completa degradação da pectina: a pectina metilesterase, a poligalacturonase e a pectina liase. A pectina liase é capaz de hidrolisar a pectina metoxilada. Entretanto, a poligalacturonase só age sobre a cadeia principal, necessitando previamente da ação da pectina metilesterase, que não é capaz de degradar a cadeia principal, mas age retirando os radicais metil ésteres. A retirada destas cadeias laterais é fundamental para que a poligalacturonase possa agir sobre a pectina (KLAHORST, 2003).

A utilização de pectinases na clarificação de sucos de fruta tem sido reportada por diversos autores. CRUESS & CELMER (1938) e FOGARTY & WARD (1974) aplicaram a enzima em suco de maçã, observando que não houve alterações em suas características sensoriais. Em suco de uva, a clarificação com pectinase possibilitou o aumento de rendimento de extração e a utilização de membranas com menor tamanho de poros (HASHIZUME & LATTIMER, 1974). A redução da viscosidade do suco também foi reportada por VÍQUEZ, *et al*. (1981) em suco de banana.

SREENATH *et al*. (1994) ao utilizarem pectinase e celulase comerciais, em suco de abacaxi, constataram o aumento do rendimento de 72% para 81-86%. Entretanto, quando comparados aos sucos não tratados, os hidrolisados não foram considerados sensorialmente aceitáveis.

BRASIL *et al*. (1996) utilizaram enzimas pectinolíticas em suco de goiaba, obtendo o aumento do rendimento de suco e redução na viscosidade. Com o mesmo objetivo, CARDOSO *et al*. (1998) utilizaram pectinase, invertase e glicose-isomerase em purê de banana, constatando ainda o aumento da doçura quando aplicada a invertase.

3.2.3 Preparações enzimáticas

Atualmente, estão disponíveis diversas preparações enzimáticas comerciais. A Pectinex® é uma preparação enzimática que combina pectinaliase, poligalacturonase, pectinesterase e hemicelulase. É caracterizada por assegurar a quebra das arabinanas (ou arabanas), polissacarídeos formados por unidades de L-arabinose (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Prevenindo, portanto, a formação de turbidez secundária, durante a estocagem dos sucos concentrados (NOVOZYMES, 1992; NOVOZYMES, 2007b).

Há, ainda, preparações enzimáticas específicas para a utilização em sucos cítricos. Estas enzimas aumentam o rendimento da extração de suco e promovem a degradação parcial das substâncias pécticas. Uma delas é a Citrozym cloudy® 100 L, uma preparação de enzimas pectolíticas, onde se encontram pectinases, hemicelulases e celulases. É produzida por *Aspergillus niger*, contendo principalmente pectina liase, endo-poligalacturonase e, pouca atividade pectinesterases e exo-poligalacturonase. Esta preparação é ideal para utilização na produção de sucos cítricos onde se pretende manter a estabilidade da turvação ou *cloudy* (NOVOZYMES, 2007a; NOVOZYMES, 2002).

Outra preparação pectolítica, específica para cítricos, a Citrozym ultra® L., produzida pelos microrganismos *Aspergillus niger* e *Aspergillus aculeatus* contendo, principalmente, pectinases, hemicelulases e celulases. É apropriada para a clarificação de sucos de limão e lima, tornando-os límpidos (NOVOZYMES, 2007a; NOVOZYMES, 2005).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Matéria - Prima

Foram utilizadas limas ácidas (*Citrus latifolia*, Tanaka.) da cultivar *Tahiti*, obtidas por plantio convencional e biodinâmico, ambas da safra de maio/junho de 2005. Foram adquiridos 19 Kg de lima ácida convencional no Mercado de Benfica no Rio de Janeiro, provenientes do estado de São Paulo. Dezoito quilos da lima ácida orgânica biodinâmica, certificada pelo Instituto Biodinâmico (IBD), foram fornecidos pela Fazenda Bom Jesus, localizada no município de Santa Rita do Passa Quatro, no estado de São Paulo (Latitude: 21graus, 43min/Longitude: 47graus, 29min).

No preparo do solo para o cultivo da lima ácida biodinâmica foi utilizado o formicida MACEX – isca, formicida granulado obtido de extratos de plantas da flora nativa brasileira, polpa de maçã e ácidos graxos orgânicos (atestado pelo I.P.T (SP) através do relatório de ensaio nº 881 789 de 06 de Julho de 2001), sendo um produto isento de toxicidade, estável a temperatura ambiente e ao ar e biodegradável, aprovado pela certificadora alemã de produtos orgânicos, BCS ÖKO-GARANTIE GMBH, por tratar-se de um insumo compatível com o regulamento ecológico da União Européia CEE 2092/91. A forma granulada foi utilizada por ser altamente atrativa e eficiente, pois as formigas transportam a isca para o interior do ninho, contaminando todo o formigueiro sendo também de fácil manejo para os trabalhadores. Produto específico, sendo o alvo somente formigas cortadeiras, não atingindo mamíferos, abelhas, peixes e outros insetos não alvo.

Os frutos foram codificados como: LC (lima ácida convencional) e LB lima ácida biodinâmica. Cada um dos grupos foi separado em 5 lotes com 10 unidades experimentais por lote, retiradas aleatoriamente. Desta forma, cada lote dos grupos experimentais LC e LB continham aproximadamente 3,8Kg e 3,6Kg de frutos, respectivamente.

3.3.2 Obtenção dos Sucos

Após a seleção dos frutos íntegros, sem injúrias, procedeu-se à pesagem e higienização por imersão em água clorada a 100 ppm por 10 minutos, seguida de lavagem em água corrente para a remoção de resíduos. Os sucos foram extraídos em multiprocessador doméstico e peneirados para que fosse retirada a polpa remanescente. O acondicionamento foi realizado em recipientes de PVC, e os sucos armazenados em freezer a –10°C.

3.3.3 Otimização da Hidrólise Enzimática

A otimização da hidrólise enzimática foi realizada a fim de se selecionar a enzima de melhor eficiência quanto à redução do tamanho das partículas dos sucos de lima ácida, assim como conhecer a concentração e o tempo de incubação ideais para futura aplicação na clarificação dos sucos em processos com membranas.

Para isso, foram realizados 5 ensaios experimentais, em escala de laboratório. O delineamento estatístico foi aplicado em duplicata, utilizando-se os valores máximo, mínimo e médio dos tempos de incubação e a concentração de cada enzima (Citrozym ultra® L, Citrozym cloudy® 100L e Pectinex®) (Tabela 5).

Para cada um dos grupos experimentais separou-se, em duplicata, alíquotas de 150 mL do suco de lima ácida, as quais foram aquecidas em banho-maria a 30°C. As enzimas foram, então, adicionadas e as amostras mantidas por 20, 40 ou 60 minutos, para cada concentração,

sob agitação controlada em banho-maria. O procedimento foi realizado para cada uma das enzimas.

Tabela 5. Concentração de enzima x tempo de incubação a 30°C.

Ensaios	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Quantidade (mL)	0,1	0,5	0,1	0,5	0,3
Tempo (min)	20	20	60	60	40
Concentração (%)	0,07	0,3	0,07	0,3	0,2

3.3.4 Análise do Tamanho de Partículas

Após a hidrólise enzimática, a freqüência e o tamanho de partículas dos sucos foram determinados pelo método ótico de difração e reflexão com raio laser, no analisador de partículas ANALYSETTE 22, Fritsch GmbH, Malaysic (1993). A configuração do equipamento para a realização das análises foi: agitação de 49 rpm, velocidade da bomba de 29 rpm, distância da célula de 57mm a 474mm, faixa de leitura de 0,16 µm a 1088 µm, sem a utilização de banho com ultra-som.

3.3.5 Açúcares: glicose, frutose e sacarose

O preparo das amostras foi pesado 1,0g do suco de lima ácida. Após a adição de 5mL de água Milli Q, a alíquota foi levada ao ultra-som por 20 minutos. Foram adicionados 5 mL de acetonitrila e o volume foi completado com água MilliQ em balão volumétrico de 25 mL. Seguiu-se a filtragem em papel de filtro e o acondicionamento em frascos de vidro. As amostras foram mantidas em freezer a -18°C, para posterior determinação. Os teores de frutose, glicose e sacarose foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo Alliance, coluna WAT 044355 de fase reversa grupamento amino, fase móvel na proporção de 25:75 (água Milli Q/acetonitrila), vazão de 1mL/ min., e detector de índice de refração W410.

3.3.6 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados no programa *Statistica* 5.1, pelo teste ANOVA. A comparação entre médias foi realizada pelo teste *Least Significative Diference* (LSD), em nível de 5% probabilidade.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Análise do Tamanho de Partículas dos Sucos Integrais

Os sucos integrais de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica, antes de serem submetidos à hidrólise enzimática, apresentaram partículas de tamanhos que variaram entre 0,16 µm a 1088 µm. No suco convencional, observou-se um crescimento gradual da concentração de partículas de tamanho superior a 400 µm. Por outro lado, no suco orgânico biodinâmico há uma distribuição uniforme na faixa de 400 a 1000 µm. (Figura 7).

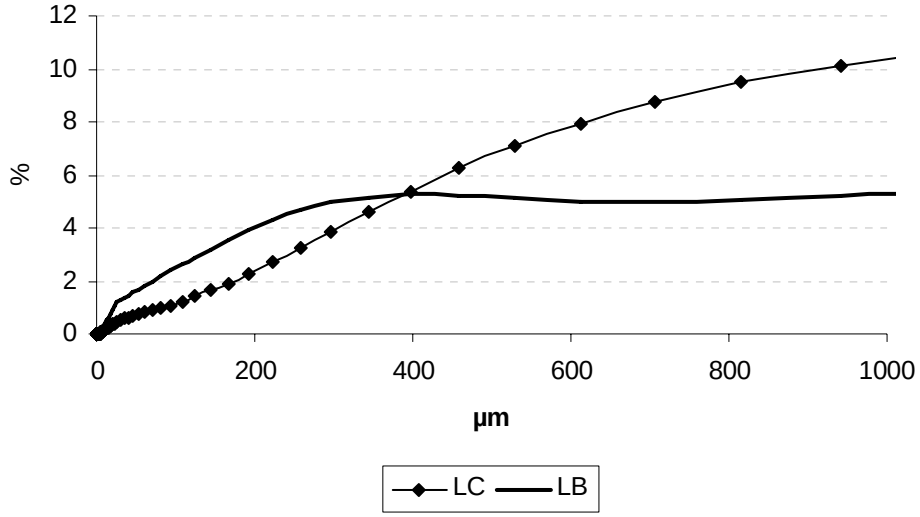


Figura 7. Volume de distribuição (%) do tamanho de partículas em suco de lima ácida convencional (LC) e orgânica biodinâmica (LB).

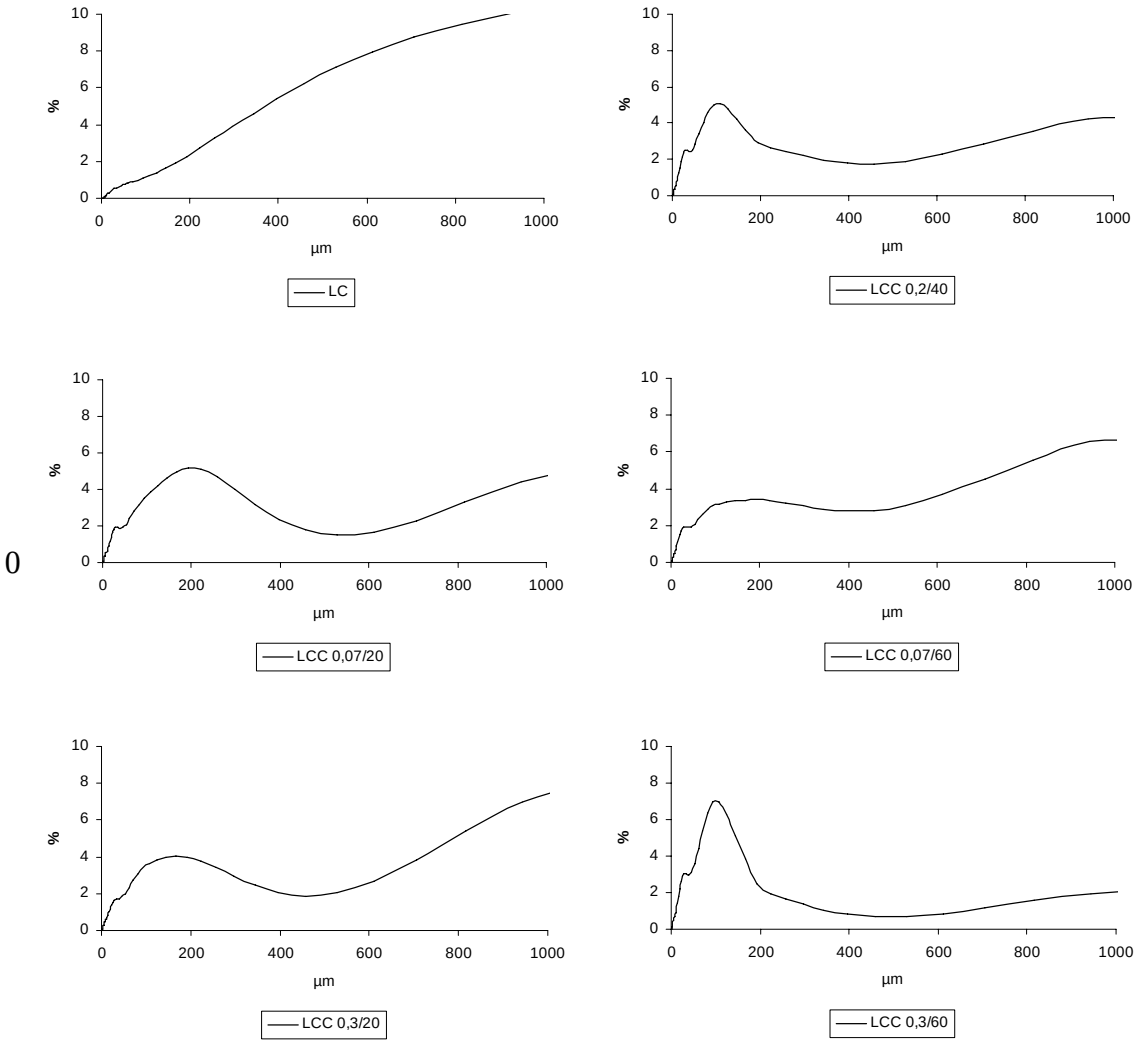
De acordo com esta informações, poderia-se supor que o suco biodinâmico seria mais facilmente hidrolisado, visto que apresenta uma concentração menor de partículas acima de 400 µm, quando comparado ao convencional.

3.4.2. Hidrólise com Citrozym cloudy® 100 L

3.4.2.1. Análise do Tamanho de Partículas

A utilização de Citrozym cloudy® 100 L na hidrólise do suco de lima ácida convencional foi aplicada em três concentrações (0,07, 0,2 e 0,3%) e três tempos de incubação (20, 40 e 60 minutos). Os resultados podem ser observados na Figura 8.

A utilização de 0,3% de enzima por 60 minutos (LCC 0,3/60) foi a mais eficiente no suco LC, acarretando a redução da maioria das partículas a tamanhos menores do que 200 µm. O tratamento de concentração e tempo intermediários (LCC 0,2/40) também ocasionou uma redução importante do tamanho de partículas, quando comparado ao suco integral (LC) e aos demais tratamentos (LCC 0,07/20; LCC 0,07/60 e LCC 0,3/20). Observou-se ainda que baixas concentrações de Citrozym cloudy® (0,07%) ou um tempo de incubação reduzido (20 minutos), podem reduzir o tamanho de partículas de forma acentuada, apesar de não estar entre as condições de hidrólise mais eficientes.



0

Figura 8. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida convencional, hidrolisado com Citrozym cloudy® 100 L. LC: suco integral. LCC 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% e enzima por 40 minutos; LCC 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos; LCC 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos; LCC 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos e, LCC 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos.

Resultados semelhantes foram obtidos por CARVALHO *et al*. (2006), ao aplicarem a enzima Citrozym cloudy® na hidrólise de suco de limão (*Citrus limon*, L). Os autores observaram que ao utilizar 0,1; 0,3 ou 0,5% da enzima, incubados por 20, 40 ou 60 minutos, a maior redução no tamanho de partículas ocorreu em concentração e tempo intermediários (0,3% por 40 minutos). A concentração considerada pelos autores como intermediária, 0,3%, na presente dissertação é concentração mais elevada dentre as utilizadas, sendo considerada intermediária a de 0,2%. Consequentemente, CARVALHO *et al*. (2006) conseguiram uma hidrólise efetiva com 0,3% por 40 minutos, enquanto que neste trabalho o resultado mais efetivo foi o de 0,3% por 60 minutos.

Portanto, 0,3% seria a concentração adequada para a utilização da Citrozym cloudy®. Baseado na literatura consultada, supõe-se que seriam necessários apenas 40 minutos, ao invés dos 60 minutos empregados neste trabalho, para uma hidrólise eficaz do suco de lima ácida convencional.

Foram realizados os mesmos tratamentos submetidos ao suco de lima ácida convencional, no suco orgânico biodinâmico (Figura 9).

Assim como no suco convencional, o tratamento com 0,3% de Citrozym cloudy®, incubada por 60 minutos (LBC 0,3/60) foi o que proporcionou a maior redução do tamanho de partículas, tornando a maior parte destas menores do que 200 µm. Ao se adotar a concentração e o tempo intermediários (LBC 0,2/40) a eficiência da hidrólise manteve-se intermediária; nem tão acentuada quanto no LCB 0,3/60, nem tão branda quanto nos demais tratamentos. Estes tratamentos (LBC 0,07/20; LBC 0,07/60; LBC 0,3/20) acarretaram uma redução muito discreta no tamanho das partículas, e portanto, similarmente ao que ocorre com o suco convencional, não se apresentam como condições de hidrólise eficazes.

Portanto, pode-se concluir que a utilização de 0,3% Citrozym cloudy® por 60 minutos é o tratamento mais adequado para a redução do tamanho de partículas à dimensões menores do que 200 µm, no suco de lima ácida biodinâmica.

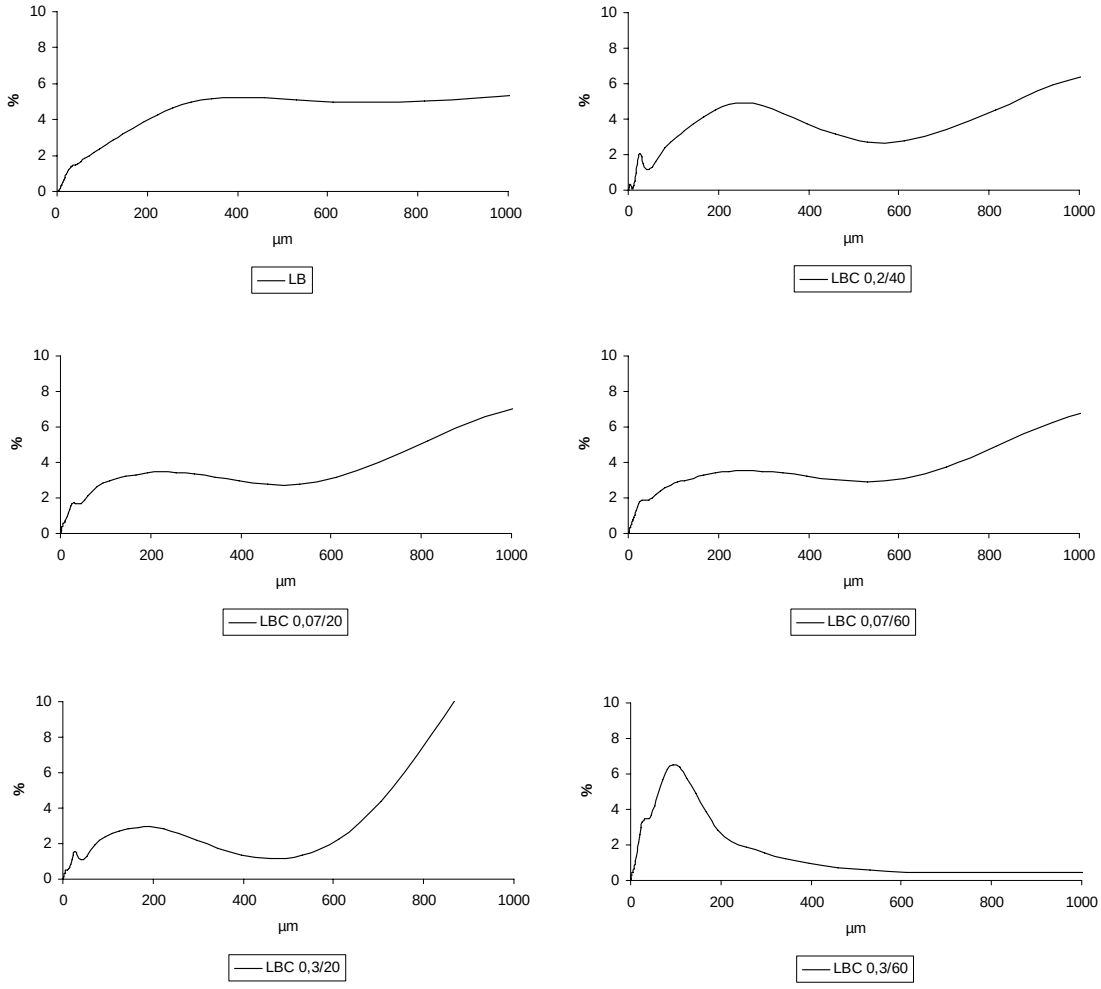


Figura 9. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Citrozym cloudy® 100 L. LB: suco integral; LBC 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% de enzima por 40 minutos; LBC 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos; LBC 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos; LBC 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos e, LBC 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos.

3.4.2.2. Açúcares

As concentrações de frutose, glicose e sacarose encontradas para cada tratamento de hidrólise com a enzima Citrozym cloudy® 100 L, nos grupos LC e LB, estão representadas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Nas amostras do grupo LC observou-se que nenhum dos tratamentos alterou as concentrações de frutose, que variaram de 0,89 a 0,97 g/100g, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. O mesmo ocorreu em relação a sacarose, cujo teores variaram de 0 a 0,06 g/100g. Entretanto, as concentrações de glicose foram significativamente reduzidas quando aplicada a hidrólise com maior concentração enzimática e maior tempo de incubação (0,3/60); passando de 0,87 g/100g, no suco integral, para 0,78 no hidrolisado.

Tabela 6. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida convencional hidrolisado com Citrozym cloudy® 100 L.

Tratamento	Frutose (g/100g)	Glicose (g/100g)	Sacarose (g/100g)
0,07 / 60	0,965 ± 0,0354	0,915 ± 0,0919	0,055 ± 0,0778
0,07 / 20	0,950 ± 0,0141	0,810 ± 0,0424	0,035 ± 0,0495
0,3 / 60	0,890 ± 0,0141	0,775 ± 0,0071	ND
0,3 / 20	0,965 ± 0,0495	0,895 ± 0,0212	ND
0,2 / 40	0,895 ± 0,1061	0,810 ± 0,0566	0,055 ± 0,0778

* 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos. 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos. 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos. 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos. 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% de enzima por 20 minutos.

Quando o processo de hidrólise foi aplicado ao suco orgânico biodinâmico (LB), os teores de frutose, glicose e sacarose não foram alterados. As concentrações de frutose estiveram em torno de 0,58 a 0,63 g/100g, as de glicose entre 0,40 a 0,52 g/100g e as de sacarose variaram entre 0,08 e 0,13 g/100g.

Tabela 7. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Citrozym cloudy® 100 L.

Tratamento	Frutose (g/100g)	Glicose (g/100g)	Sacarose (g/100g)
0,07 / 60	0,615 ± 0,0212	0,400 ± 0,0707	0,130 ± 0,0707
0,07 / 20	0,600 ± 0,0707	0,405 ± 0,0636	0,110 ± 0,0000
0,3 / 60	0,630 ± 0,0849	0,520 ± 0,0566	0,105 ± 0,0212
0,3 / 20	0,580 ± 0,0000	0,520 ± 0,0283	0,080 ± 0,0141
0,2 / 40	0,600 ± 0,0000	0,420 ± 0,0566	0,110 ± 0,0141

* 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos. 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos. 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos. 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos. 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% de enzima por 20 minutos.

Desta forma, observou-se que o único tratamento que acarretou uma alteração no teor de açúcares foi, justamente, aquele de maior eficácia na redução do tamanho de partículas (LCC 0,3/60). Cabe ressaltar que esta alteração, a redução da concentração de glicose, ocorreu apenas no suco convencional, ou seja, naquele cujo teor de glicose era inicialmente mais elevado.

3.4.3. Hidrólise com Citrozym ultra® L

3.4.3.1. Tamanho de partículas

Os resultados obtidos para os tratamentos realizados com a enzima Citrozym ultra® L, no grupo LC, estão descritos na Figura 10.

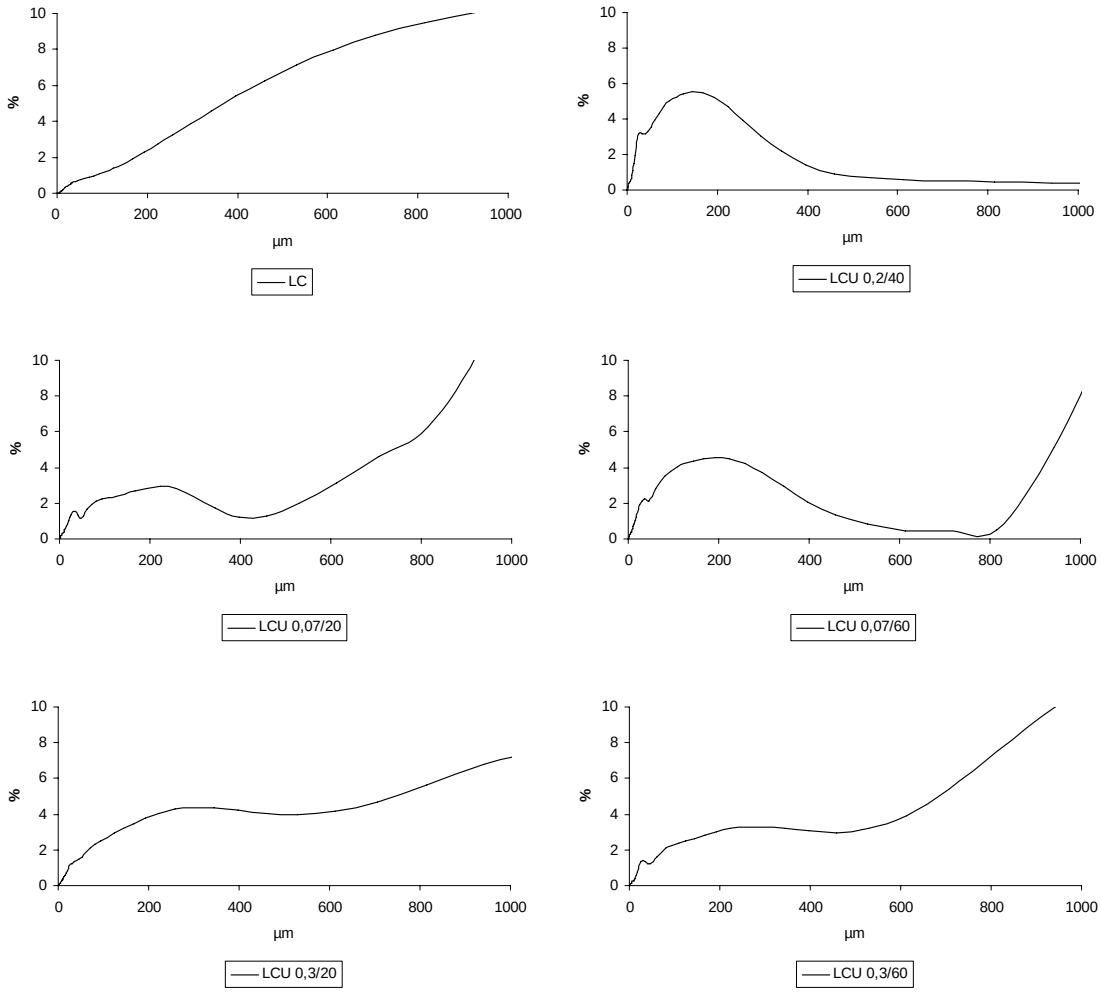


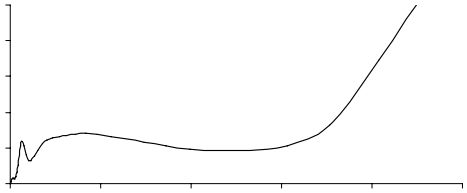
Figura 10. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida convencional hidrolisado com Citrozym ultra® L. LC: suco integral. LCU 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% de enzima por 20 minutos. LCU 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos. LCU 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos. LCU 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos. LCU 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos.

Em relação a utilização da Citrozym ultra®, constatou-se que o tratamento de tempo e concentração intermediários (LCU 0,2/40) foi o que proporcionou melhores condições de hidrólise. Neste caso, a maior concentração de partículas esteve em torno de 200 µm.

Cabe ressaltar que esta preparação enzimática é apropriada para a clarificação de sucos de limão e lima, tornando-os límpidos (NOVOZYMES, 2007a; NOVOZYMES, 2005). Foi observado que, os sucos hidrolisados com Citrozym ultra®, apresentavam uma aparência mais límpida do que os demais. Em contrapartida, apresentavam um precipitado flocoso, de dimensões visivelmente maiores do que os sucos hidrolisados com Citrozym cloudy® ou Pectinex®. Esta observação vai de encontro com o que foi reportado por LEE, *et al*. (2006). Os autores descrevem que a pectinase hidrolisa a pectina, levando a floculação de complexos pectina-proteína, resultando em sucos com reduzido teor de macromoléculas. Desta forma, a viscosidade do suco é reduzida, facilitando o processo de clarificação subseqüente.

Este fenômeno poderia justificar o fato de todos os demais tratamentos apresentarem uma concentração alta de partículas maiores de que 800 µm. Desta forma, seria necessário avaliar a redução da viscosidade do suco, associada ao tamanho de partículas, para se ter certeza se não houve uma hidrólise eficaz, ou se houve uma agregação das partículas hidrolisadas.

Na Figura 11, pode-se observar os resultados da hidrólise realizada no suco LB, com a enzima Citrozym ultra®.



igura 11. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida orgânica iodinâmica hidrolisado com Citrozym ultra® L. LC: suco integral. LBU 0,2/40: suco hidrolisado com ,2% de enzima por 20 minutos. LBU 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 inutos. LBU 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos. LBU 0,3/20: suco idrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos. LBU 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima or 60 minutos.

Os resultados obtidos para a hidrólise do suco LB foram similares àqueles observados o suco LC, com exceção da condição LBU 0,2/40. Neste caso, observou-se que no suco

e

m pico. Este pico ind

3.4.3.2. Açúcares

As concentrações de frutose, glicose e sacarose encontradas para cada tratamento de hidrólise com a enzima Citrozym ultra® L, nos grupos LC e LB, estão representadas nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

De maneira semelhante à enzima descrita acima, a Citrozym ultra® também não promoveu alterações nas concentrações de frutose e sacarose, em ambos os grupos. Assim, no grupo LC, os teores de frutose e sacarose foram de 0,88 a 0,98 g/100g e de 0 a 0,05 g/100g, respectivamente. No grupo LB, este valores variaram de 0,57 a 0,66 g/100g para frutose e de 0,10 a 0,15 g/100g para sacarose.

Tabela 8. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida convencional hidrolisado com Citrozym ultra® L.

Tratamento	Frutose (g/100g)	Glicose (g/100g)	Sacarose (g/100g)
0,07 / 60	0,880 ± 0,0283	0,850 ± 0,0566	ND
0,07 / 20	0,975 ± 0,0212	0,845 ± 0,0071	ND
0,3 / 60	0,935 ± 0,0212	0,750 ± 0,1273	ND
0,3 / 20	0,885 ± 0,0495	0,790 ± 0,0424	0,045 ± 0,0636
0,2 / 40	0,940 ± 0,0283	1,000 ± 0,0141	ND

* 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos. 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos. 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos. 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos. 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% de enzima por 20 minutos.

Com relação a glicose, apenas o tratamento de concentração e tempo intermediários (0,2/40), no grupo LC, promoveu o aumento dos teores deste açúcar de 0,87 (no suco integral) para 1,00 g/100g. No grupo LB, a glicose permaneceu em concentrações semelhantes as iniciais, variando de 0,43 a 0,49 g/100g.

Novamente, a condição de hidrólise que alterou o teor de açúcares, foi aquela considerada ideal para a redução do tamanho de partículas, e ocorreu apenas no suco convencional. Entretanto, em oposição ao ocorrido com a utilização da Citrozym cloudy®, a concentração de glicose foi aumentada com a Citrozym ultra®, e não reduzida. Considerando-se que ambas as preparações enzimáticas continham pectinases, hemicelulases e celulases, pôde-se supor que alterações de características físicas e químicas da solução podem ter influenciado na disponibilidade da glicose no meio. Desta forma, o suco hidrolisado com Citrozym ultra®, de aspecto mais límpido, teria uma concentração maior de glicose em solução. Em contrapartida, no suco hidrolisado com Citrozym cloudy®, cujas partículas em suspensão estavam mais homogêneas, poderia haver mais moléculas de glicose retidas nestas partículas, tornando mais difícil sua detecção.

Tabela 9. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Citrozym ultra® L.

Tratamento	Frutose (g/100g)	Glicose (g/100g)	Sacarose (g/100g)
0,07 / 60	0,660 ± 0,1273	0,490 ± 0,0424	0,100 ± 0,0141
0,07 / 20	0,615 ± 0,0071	0,425 ± 0,0212	0,150 ± 0,0141
0,3 / 60	0,615 ± 0,0636	0,435 ± 0,0495	0,140 ± 0,0000
0,3 / 20	0,600 ± 0,0424	0,425 ± 0,0212	0,135 ± 0,0212
0,2 / 40	0,565 ± 0,0071	0,485 ± 0,212	0,100 ± 0,0141

* 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos. 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos. 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos. 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos. 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% de enzima por 20 minutos.

3.4.4. Hidrólise com Pectinex®

3.4.4.1. Tamanho de partículas

Os resultados obtidos na hidrólise do suco LC com a enzima Pectinex® podem ser observados na Figura 12.

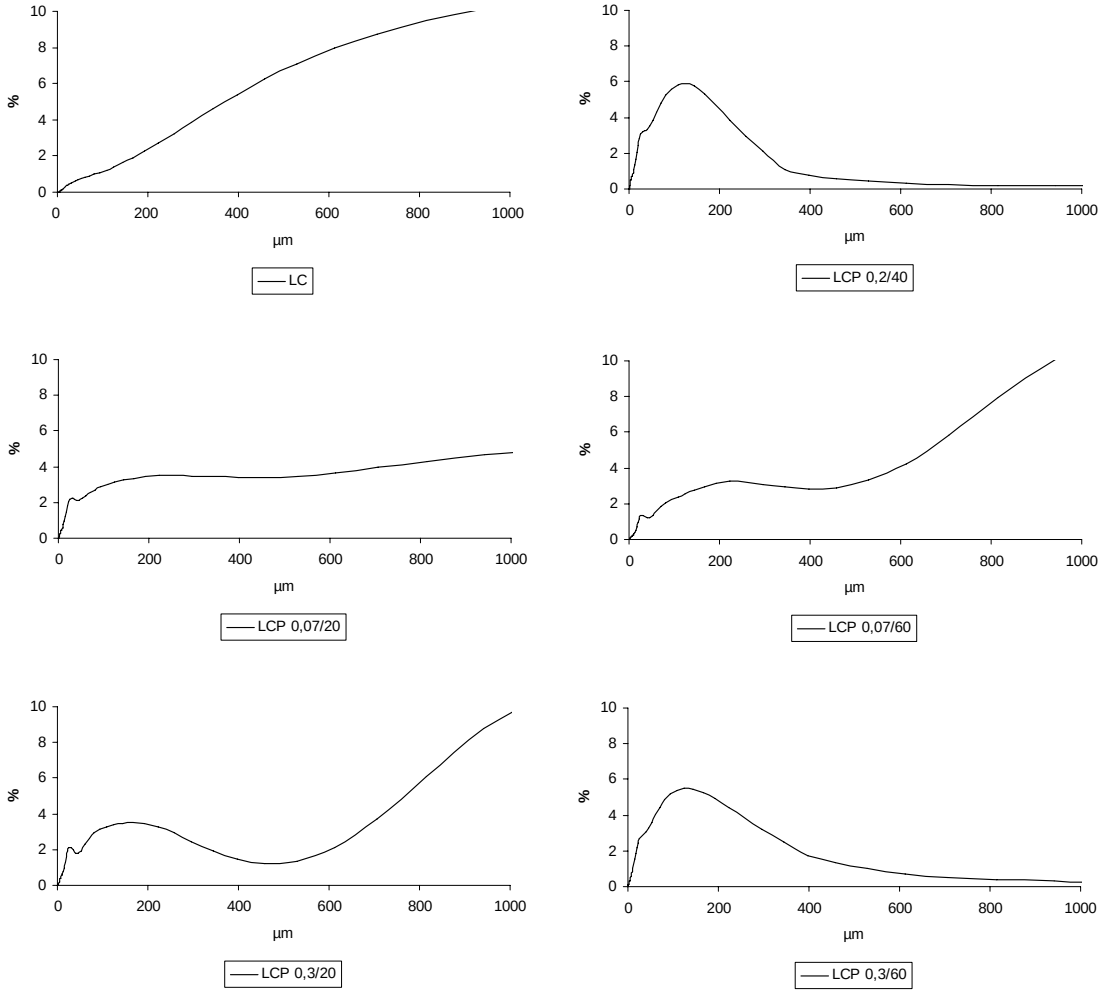


Figura 12. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida convencional hidrolisado com Pectinex®. LC: suco integral. LCP 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% de enzima por 20 minutos. LCP 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos. LCP 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos. LCP 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos. LCP 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos.

Novamente as condições com 0,2 e 0,3% de enzima, por 40 e 60 minutos, respectivamente, foram as que proporcionaram uma redução do tamanho de partículas mais acentuada (LCP 0,2/40 e LCP 0,3/60). No tratamento de concentração e tempo mais baixos (LCP 0,07/20) houve uma hidrólise mais acentuada das partículas maiores do que 400 µm. Por outro lado, quando empregadas condições de extremos; LCP 0,07/60 e LCP 0,3/20; os resultados são muito semelhantes entre si, demonstrando uma hidrólise mais acentuada das partículas na faixa de 400 e 600 µm.

A enzima Pectinex® 3X L foi utilizada também por SIN *et al*. (2006), a fim de estabelecer o tempo de incubação, temperatura e concentração enzimática, para a hidrólise de suco de sapoti (*Acharas sapota*). Desta maneira, as condições ótimas para clarificação

enzimática foram de 0,1% de enzima a 40°C, por 120 minutos. Observa-se que os autores utilizaram concentrações enzimáticas mais baixas em relação àquelas empregadas no presente trabalho, porém temperaturas mais altas e tempo de incubação duas vezes maior.

Experimento semelhante foi realizado por LIEW ABDULLAH *et al*. (2007), com carambola (*Carambola averrhoa*, L.) utilizando a concentração de 0,1% de Pectinex® Ultra SP-L incubada a 30°C por 20 minutos, tendo sido eficiente na hidrólise da polpa do fruto.

LEE *et al*. (2006) utilizaram Pectinex® Ultra SP-L associada a AMG 300L, uma enzima amilolítica, para hidrolisar polpa de banana (*Musa sapientum*, cv. Berangan). Os autores observaram que diferentes condições como, concentração enzimática, temperatura e tempo de incubação, podem alterar, significativamente, a filtrabilidade, a clarificação, a turbidez e a viscosidade da polpa de banana. Provavelmente, estes parâmetros também são alterados no suco de lima ácida, a partir da variação das condições de hidrólise, o que é esperado e satisfatório, tendo em vista a observação da visível alteração no perfil do volume de distribuição do tamanho de partículas, nas diferentes condições de hidrólise.

Desta forma, conclui-se que a utilização de 0,2% de Pectinex® por 40 minutos é suficiente para hidrolisar o suco convencional a partículas menores do que 200 µm. Apesar de o tratamento com 0,3% por 60 minutos ter sido muito eficaz, pode-se observar que houve um remancente de 2,5% de partículas maiores que 200 µm, enquanto que no 0,2/40, houveram apenar 1% destas partículas.

Os resultados encontrados no suco LB podem ser observados na Figura 13.

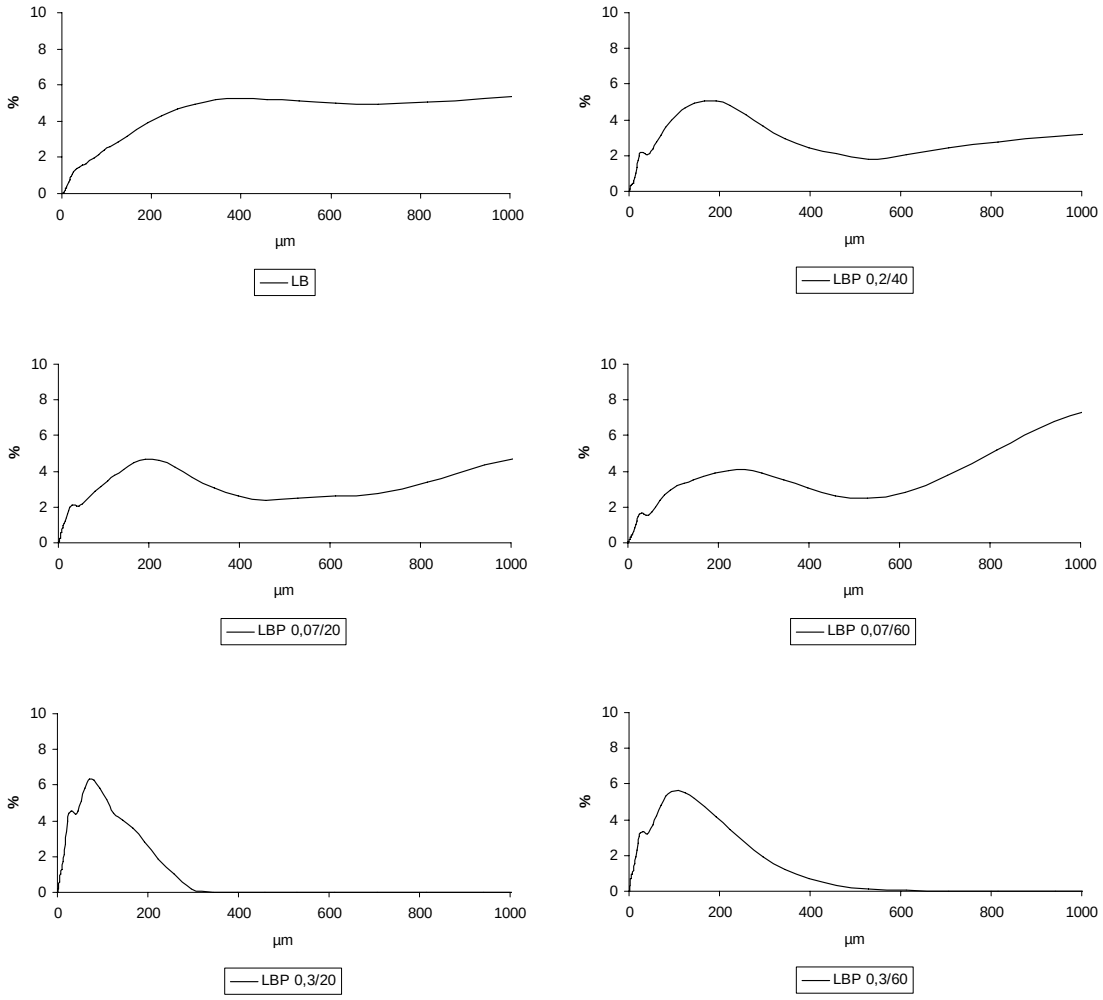


Figura 13. Volume de distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida orgânico

tendendo a zero. Portanto, o aumento apresentado no suco LC, por exemplo, foi de 0,04 g/100g para 0,16 g/100g no suco hidrolisado com 0,07% de Pectinex® por 60 minutos. De forma semelhante, no grupo LB, o teor inicial de sacarose, que era de 0,11 g/100g, passou a 0,19 g/100g nestas mesmas condições de hidrólise.

Mais uma vez, a alteração na concentração de açúcares ocorreu em uma condição de redução expressiva do tamanho de partículas. Neste caso, a condição de 0,3% por 60 minutos (LCP 0,3/60 e LBP 0,3/60). Contudo, outras condições de hidrólise eficazes não apresentaram esta alteração no teor de sacarose, como as de 0,2% por 40 minutos (no suco convencional - LCP 0,2/40) e 0,3% por 20 minutos (no suco biodinâmico - LBP 0,3/20).

Tabela 11. Frutose, glicose e sacarose em suco de lima ácida orgânica biodinâmica hidrolisado com Pectinex®.

Tratamento	Frutose (g/100g)	Glicose (g/100g)	Sacarose (g/100g)
0,07 / 60	0,555 ± 0,0071	0,465 ± 0,0212	0,190 ± 0,0141
0,07 / 20	0,630 ± 0,0566	0,505 ± 0,0778	0,090 ± 0,0000
0,3 / 60	0,530 ± 0,0141	0,550 ± 0,0283	0,170 ± 0,0141
0,3 / 20	0,575 ± 0,0071	0,405 ± 0,1202	0,155 ± 0,0071
0,2 / 40	0,550 ± 0,0283	0,475 ± 0,0495	0,090 ± 0,0283

* 0,07/20: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 20 minutos. 0,07/60: suco hidrolisado com 0,07% de enzima por 60 minutos. 0,3/20: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 20 minutos. 0,3/60: suco hidrolisado com 0,3% de enzima por 60 minutos. 0,2/40: suco hidrolisado com 0,2% de enzima por 20 minutos.

Com base nas presentes observações pôde-se avaliar que dentre as 30 condições de hidrólise testadas (3 enzimas x 5 tratamentos x 2 amostras), apenas seis situações promoveram a alteração estatisticamente significativa dos teores de açúcares. Destas, apenas duas ocorreram no suco orgânico biodinâmico: a elevação do teor de sacarose com a aplicação de 0,07% ou 0,3% de Pectinex® por 60 minutos. Todas as demais alterações ocorreram no suco de lima ácida convencional: a redução do teor de glicose com 0,3% de Citrozym cloudy® por 60 minutos; a elevação do teor de glicose com 0,2 % de Citrozym ultra® por 40 minutos e; a elevação do teor de sacarose com 0,07 ou 0,3% de Pectinex® por 60 minutos.

Outro ponto importante é que as enzimas Citrozym cloudy® e Citrozym ultra®, promoveram alterações nas concentrações de glicose, enquanto que a Pectinex® alterou apenas a sacarose. Isto pode ser explicado pelo fato de a Pectinex® não conter celulases e, por conseguinte, não ter promovido a liberação de glicose no meio. Por outro lado, a Citrozym cloudy®, que possui celulases, acarretou a redução, e não a aumento do teor de glicose, quando utilizada em 0,3% por 60 minutos. Possivelmente o comportamento das partículas presentes no suco tenha influenciado neste fenômeno.

Contrariamente, quando utilizada a Citrozym ultra®, a 0,2% por 40 minutos, observou-se o aumento da concentração de glicose. Cabe ressaltar que, além da presença de celulases nesta preparação enzimática, o tratamento 0,2/40 foi o de maior eficiência na redução do tamanho de partículas (LCU 0,2/40, na Figura 10). Isto pode ter levado a uma maior exposição às celulases e consequentemente a uma liberação maior de glicose no meio.

Contudo, a decisão acerca da condição ideal de hidrólise depende da realização de análises complementares, como viscosidade, turbidez, características sensoriais, por exemplo. Isto pode ser aplicado, da mesma maneira, nos sucos provenientes tanto de frutos cultivados por métodos convencionais, quanto para àqueles orgânicos biodinâmicos.

3.5 CONCLUSÕES

Desta forma, conclui-se que para as enzimas Citrozym cloudy® e Pectinex®, as condições ideais de hidrólise, tendo como base a redução do tamanho de partículas, são 0,3% da enzima incubados por 60 minutos, tanto para o suco convencional, quanto para o biodinâmico. Quando utilizada a Citrozym cloudy®, observou-se que esta condição de hidrólise acarretaria a redução da concentração de glicose, apenas no suco convencional; enquanto que nestas mesmas condições a Pectinex® levaria a um aumento nos teores de sacarose, em ambos os sucos.

No caso da Pectinex®, as condições de 0,2% por 40 minutos (para o suco convencional) e 0,3% por 20 minutos (para o suco biodinâmico) também se mostraram eficazes na redução de tamanho de partículas, sem ocasionarem alterações no teor de açúcares.

A Citrozym ultra® pode ser aplicada a ambos os sucos, em condições de 0,2% por 40 minutos, com resultados satisfatórios, acarretando a elevação do teor de glicose no suco de lima ácida convencional.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Pode-se concluir que, a lima ácida cultivada em lavouras onde são aplicados os princípios da agricultura biodinâmica, apresenta um potencial interessante para a produção de suco. Quando comparadas aos frutos provenientes de lavouras convencionais, estas limas foram semelhantes em relação a acidez titulável total, pH, ácido ascórbico, sacarose, cálcio e zinco. Isto indica que as diferenças empregadas nos dois métodos de produção; convencional e orgânico biodinâmico; não interfeririam no conteúdo destes nutrientes no produto final.

alguns nutrientes mostraram-se mais sensíveis a estas variações, ncontrando-se em quantidades distintas quando foram comparadas as safras de maio/junho de 200

encionais. Cabe ressaltar que ambos os frutos são provenientes da mesma

vou-se que as condições ideais para as enzimas Citrozym cloudy® e Pectinex®, tendo como base a redução do tamanho de

bservou-se que esta mesma condição de hidrólise acarretaria a redução da conc glicose

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, B. **Observations on the chemical method for the estimation of vitamin C.** Biochem J. February; 29, v.2, p. 275–281. 1935.

ALTIERI, M. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável.** Guaíba: Agropecuária, 2002. 592p.

ASSOCIAÇÃO DE AGRICULTORES BIOLÓGICOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Normas técnicas para a certificação de produtos orgânicos**. Versão 2002. Disponível em <http://www.abio.org.br/certificar.php>. Acesso em 10 jul. 2005.

ÁVILA, João Carlos; **Princípios Básicos do Método Biodinâmico**. Sociedade Antroposófica no Brasil, 2000. Disponível em <http://www.sab.org.br/agric-biod/principios.htm> . Acesso em 20 out 2005.

BARTH, C.; TULLIO, M.; CONKLIN, P.L. **The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence**. Journal of Experimental Botany, v. 57, n. 8, 2006. p. 1657-1665.

BEAN, R.C. **Carbohydrate metabolism of citrus fruits I. Mechanisms of sucrose synthesis in oranges and lemons**. Plant Physiol., v.35, n.4, Julho, 1960. p. 429-434.

BEAN, R.C. & TODD, G.W. **Photosynthesis and Respiration in Developing Fruits. *I.* $C^{14}O_2$ Uptake by Young Oranges in Light and in Dark.** Plant Physiol. v.35, n.4, Julho, 1960. p. 425–429.

BEAN, R.C.; PORTER, G.G. STEINBERG, B.M. **Carbohydrate metabolism of citrus fruits. II. Oxidation of sugars by an aerodehydrogenase from young orange fruits**. The journal of Biological Chemistry. v.236, n.5, Maio, 1961. p. 1235-1240.

BENNETT, A.H. & TARBERT, D.J. **Vitamin C in *citrus* juices**. Biochem J.; 27, v.4, p.1294-1301. 1933.

BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. Varela:São Paulo. 2ª edição. 1ª reimpressão. 1992. 231p.

BONILLA, J.A.; **Fundamentos da agricultura ecológica sobrevivência e qualidade de vida.** São Paulo: Nobel, 1992. 259p.

BORGUINI, R. G., SILVA, M. V. **O conteúdo nutricional de tomates obtidos por cultivo orgânico e convencional**. Higiene Alimentar, v. 21, n.149, 2007, 41-46.

BRASIL, I. M.; MAIA, G.A. & FIGUEIREDO, R.W. **Estudo do rendimento do suco de goiaba extraído por tratamento enzimático**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v.16, n.1, 1996, p. 57-61.

BRASIL, SDA - SECRETARIA DE ORIGEM ANIMAL. **Instrução Normativa n.7 de 17 de maio de 1999**. Alterada pela Instrução Normativa n.16 de 11 de junho de 2004. Publicada no DOU de 14/06/2004, seçãoI, p.4. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7796>. Acesso em 10 abril 2008.

BRASIL, MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Padrões de Identidade e Qualidade para Suco de Lima Ácida**; **Anexo I. Instrução Normativa nº 01, de 7 de Janeiro de 2000.** Publicada no DOU de 10/01/2000, seçãoI, p.54. Disponível em http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1636 Acesso em 10 abril 2008.

BREKSA, A. P.; ZUKAS, A.A.; MANNERS, G.D.; **Determination of limonoate and nomilinoate A-ring lactones in citrus juices by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1064, n.2, 2005, p.187-191.

BURDURLU, H.S.; KOCA, N.; KARADENIZ, F. **Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage**. Journal of Food Engineering, 2005.

CARISTI, C., BELLOCCO, E., PANZERA, V., TOSCANO, G., VADALÀ, R. AND LEUZZI, U. **Flavonoids Detection by HPLC-DAD-MS-MS in Lemon Juices from Sicilian Cultivars.** J. Agric. Food Chem., v.51, n.12, 2003, p. 3528 -3534.

CARISTI, C., BELLOCCO, E.; GARGIULLI, C.; TOSCANO, G.; LEUZZI, U.; Flavone-**di-*C*-glicosides in *citrus* juices from Southern Italy**; Food Chemistry, 2005.

CARDOSO, M. H.; JACKIX, M. N. H.; MENEZES, H. C.; GONÇALVES, E. B. & MARQUES, S. V.B. **Efeito da associação de pectinase, invertase e glicose isomerase na qualidade de suco de banana**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.18, n.3, 1998, p. 275-282.

CARVALHO, L. M. J. C.; GODOY, R. L. O.; FIGUEIRA, J. A. F. & ABADIO, F. D. B. **Volatile compounds in hydrolyzed pineapple (*Ananas comosus* L. Merril), Pérola variety and, clarified pasteurized juices obtained by solid-phase microextraction**. Alimentaria, v. 33, 2002, p.129 – 132.

CARVALHO, L. M. J. C.; BORCHETTA, R.; SILVA, E. M. M.; CARVALHO, C. W. P.; MIRANDA, R.M.; SILVA, C. A. B. **Effect of enzimatic hydrolysis on particle size reduction in lemon juice (*Citrus limon*, L.), cv. Tahiti**. Braz. J. Food Technol., v.9, n.4, out./dez. 2006, p.277-282.

CHEMELLO, E. **A química na cozinha apresenta: o açúcar**. Companhia da Escola. 2005. Disponível em <http://www.ciadaescola.com.br/zoom/imgs/339/image005.jpg> . Acesso em 27/01/2006.

CHEN, Z.; YOUNG, T.E.; LING, J.; CHANG, S.; GALLIE, D.R. **Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling**. Plant Biology, March 18, v. 100, n. 6, 2003. p. 3525-3530.

CHINNICI, F.; SPINABELLI, U.; RIPONI, C.; AMATI, A.; **Optimização of the determination of organic acids and sugars in fruits juices by ion-exclusion liquid chromatography**. Journal of Food Composition and Analysis, v.18, p.121-130, 2005.

CRUESS, W.V. & CELMER, R.R. **Utilization of surplus apples**. Fruit Products J., v.17, n.11, 1938, p. 326-328.

DAROLT, M.R.; **As Principais Correntes do Movimento Orgânico e suas Particularidades**. Disponével em <http://www.planetaorganico.com.br/trabdurolt.htm> . Acesso em 20 out 2005.

DAVEY et al. **Ascorbate biosynthesis in Arabidopsis cell suspension culture**. Plant Physiol. v. 121, 1999, p. 535-543.

DEL CARO, A; PIGA, A; VACCA, V.; AGABBIO, M.; **Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage**. Food Chemistry, v.84, 2004, p. 99-105.

ELHERS, E. **Agricultura sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma**. São Paulo: Livros da Terra, 1996, 178p.

FIBL**. 'Science' gets to the heart of the 21-year DOK trial**. Activity report, 2002. Disponível em <http: www.fibl.net/english/fibl/pdf/annual - report - 2002 – soil – plants - science.pdf.>. Acesso em 12 jun 2005.

FOGARTY, J. L. F. & WARD, P. P. **Pectinases and pectic polysaccharides**. Progress in Industrial Microbiology, v.13, 1974 p. 59-119.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO; **Expert consultation carbohydrates in human nutrition.** FAO – Food and Nutrition. 66. 1998. 140p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO; **Projections of World Production and Consumption of Citrus to 2010**. Committee on Commodity Problems, Intergovernmental Group on Citrus Fruit, Thirteenth Session, Havana, Cuba, 20-23 May 2003. Disponível em <http://www.fao.org/DOCREP/MEETING/006/Y8471E.HTM>. Acesso em 23 jul 2005.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9.ed. São Paulo:Editora Atheneu. 2002. 307p.

GARCÍA-SANCHEZ F.; CARVAJAL, M.; PORRAS, I.; BOTIA, P.; MARTÍNEZ, V.; **Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of 'Fino 49' lemon**; Europ. J. Agronomy v.19, 2003, p. 427-437.

GARDNER, P.T.; WHITE, T.A.C.; McPHAIL, D.B.; DUTHIE, G.G.; **The realtive contribuition of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices**; Food Chemistry v. 68, 2000, p. 471- 474.

GIL, J. M., GRACIA, A.; SÁNCHEZ, M.; **Market segmentation and willingness to pay for organic products in Spain**; International Food and Agribusiness Management Review 3, 2000, p. 207–226.

GLIESSMAN, S.R.; **Agroecologia: Processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2000, p. 653.

GORINSTEIN, S.; BELLOSO, O. M.; PARK, Y.; HARUENKIT, R.; LOJEK, A.; CÍZ, M.; CASPI, A.; LIBMAN, I. and TRAKHETNBERG, S. **Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits**. Food Chemistry, v.74, 2001, p. 309-315.

HANSSON, A.; ANDERSSON, J.; LEUFVÉN, A.; PEHRSON, K.; **Effect of changes in pH on the release of flavour compounds from a soft drink-related model system**. Food Chemistry, v.74, 2001, p.429–435.

HARDEN, A. & ZILVA, S.S. **The antiscorbutic factor in lemon juice**. Biochem J.; 12, v.3, p. 259–269. 1918.

HASHIZUME, T. & LATTIMER, O. T. **Utilização de ULTRAZYM 100 na clarificação de suco de uva**. Coletânea do Inst. Tecn. Alimentos, v.5, 1973/1974, p. 117-127.

HASSAN, A. & BASILI, R. **The antiscorbutic value of fresh lime juice**. Biochem J.; 26 v.6, p. 1846–1850 1932.

HE, Z. L.; YANG, X.E.; PETER, J.S. **Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment**. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 19, p. 125-140. 2005.

HERBERS, K.; **Vitamin production in transgenic plants.** J. Plant Physiol. v. 160, 2003, p. 821–829.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M.; **Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods**. Food Chemistry, v.96, 2006, p. 654-664.

HODGE, J.E. & OSMAN, E.M. **Carbohydrates**. Cap 3. In: FENNEMA, Owen.R. Principles of food science. Part I – Food Chemistry. New York: Marcel Dekker, 1976. 384p.

HUFF, A. **Nutritional control if regreening and degreening in citrus pell segments**. Plant Physiol., v.73, 1983. p. 243-249.

HUFF, A. **Sugar regulation of plastid interconvertions in epicarp of citrus fruit**. Plant physiol., v.76, 1984. p. 307-312.

HULME, A. C.; **The Biochemistry of Fruits and their Products**. Academic Press, v.1, New York, 1970, 620p.

IBGE. **Tabelas de Composição de Alimentos.** Estudo Nacional da Despesa Familiar. 5.ed. Rio de Janeiro:IBGE. 1999. 137p.

IGLESIAS, D.J.; TADEO, F.R.; PRIMO-MILO, E. and TALON, M. **In vivo sucrose stimulation of colour change in citrus fruit epicarps: Interaction between nutritional and hormonal signals**. Physiologia Plantarum, v.112, n.2, junho, 2001. p. 244-250.

IBD - INSTITUTO BIODINÂMICO. **Diretrizes para o padrão de qualidade orgânico instituto biodinâmico**:associação de certificação instituto biodinâmico; 11ed, 2004.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION. **Fruit and vegetable products - Determination of soluble solids content - Refractometric method**. 1ªed. 2173:1978.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION. **Fruit and Vegetable Products – Determination of Titrable Acidity**. 2ªed. 750:1998.

IFOAM - ITERNATIONAL FEDERATION OF ORGANIC AGRICULTURE MOVEMENTS; **Consumer Preference - Does 'Organic' mean 'Quality'?** 2005. Disponível em <www.ifoam.org/organic_facts/food_quality/pdfs/Consumer_Preference_Quality.pdf>. Acesso em 23 jul 2005.

JACOMINO, A.P.; MENDONÇA, K. & KLUGE, R. A.; **Armazenamento refrigerado de limões "Siciliano" tratados com etileno**. Rev. Bras. Frutic., v.25, n.1, Jaboticabal, abr. 2003.

KLAHORST, S.J**. Enzyme solutions for fruit processors**. Food Product Design, January 2003, Disponível em <http://www.foodproductdesign.com/archive/2003/0103AP.html> Acesso em 22/03/2007.

KLUGE, R.A. **Fotossíntese**. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal. 16/12/2002. 34 p. Disponível em www.sbfv.org.br/materialdidatico/download/FotossinteseKluge.pdf . Acesso em 26/10/2006.

LAING, W.A.; BULLEY, S.; WRIGHT, M.; COONEY, J.; JENSEN, D; BARRACLOUGH, D.; MacRae, E. **A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosyntesis**. Plant Biology, November 30, v.101, n. 48, 2004. p. 16976-16981.

LEE, S. K.; KADER, A.A.; **Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops.** Postharvest Biology and Technology, v.20, 2000, p. 207–220.

LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID, N. S. A.; BAHARIN, B. S. **Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice response surface methodology (RSM)**. Journal of Food Engineering, v.73, 2006, p. 55-63.

LIEW ABDULLAH, A. G.; SULAIMAN, N. M.; AROUA, M. K.; MEGAT MOHD NOOR, M. J. **Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme**. Journal of Food Engineering, v. 81, 2007, p. 65-71.

LOEWUS, F.A. & KELLY, S. **The metabolism of D-galacturonic acid and its methyl ester in the detached ripening strawberry**. Arch. Biochem. Biophys. v. 95, 1961, p. 483-493.

LOEWUS, F. A.; **Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi**. Phytochemistry, v. 52, 1999, p. 193-210.

LORENCE, A.; CHEVONE, B.I.; MENDES, P.; NESSLER, C.L. ***myo*-inositol oxigenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis**. Plan Physiology, 134, 2004. p. 1200-1205.

MACKU, C.; SHIBAMOTO, T.; **Application of simultaneous purging and solvent extraction technique for flavour monitoring of natural product**. Food Chemistry v. 42, 1991, p. 121-127.

MARCUS, R. & COULSTON, A.M. As vitaminas. In: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 8ª ed, 1991, p.1147 -1163.

MARIN, F.R.; MARTINEZ, M.; URIBESALGO, T.; CASTILLO, S & FRUTOS, M.J.; **Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems**. Food Chem v.78, 2002, p.319 – 324.

MARSH, K. B.; FRIEL, E. N.; GUNSON, A.; LUND, C.; MACRAE, E.; **Perception of flavour in standardised fruit pulps with additions of acids or sugars**. Food Quality and Preference, v.17, 2006, p. 376–386.

MOUFIDA, S. & MARZOUK, B.; **Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and better orange**. Phytochemistry, v. 62, 2003, p.1283 – 1289.

MORILLAS RUIZ, J.M.; **Capacidad Antioxidante, Vitamina C y Polifenoles de cítricos Ecológicos vs Convencionales**. I Congresso Madrid 9-11 marzo de 2005. Nutrición hospitalaria, v.XX, Suplemento I, 2005.

NEPA-UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Versão II. 2.ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p.

NOVOZYMES. **Pectinex®: una enzima pectolítica para la industria de zumos de fruta**. Ficha técnica. Wine & juice division. Bioindustrial group. Feb. 1992

NOVOZYMES. **Enzimas para a indústria de cítricos**. 1993.

NOVOZYMES. **Citrozym cloudy® 100 L**. Ficha Técnica. Sucos e Vegetais. 2002.

NOVOZYMES. **Citrozym ultra® L**. Product Data Sheet. 2005. Disponível em <http://gusmerenterprises.com/Gusmer/products/ProductDetail.asp?DeptId=95&ProdId=271> Acesso em 20/03/2007.

NOVOZYMES. **Products and solutions**. 2007a. Disponível em <http://www.novozymes.com/en/MainStructure/ProductsAndSolutions/Juice/Cloudy+citrus+juice+treatment/Cloudy+citrus+juice+treatment.htm> Acesso em 20/03/2007.

NOVOZYMES. **Products and solutions**. 2007b. Disponível em <http://www.novozymes.com/en/MainStructure/ProductsAndSolutions/Juice/Juice+treatment+pip+fruit/> Acesso em 20/03/2007.

PEDRÃO, M.R.; BELEIA, A.; MODESTA, R.C.D.; PURDENCIO-FERREIRA, S.H.; **Estabilidade físico-química e sensorial do suco de limão Tahiti natural e adoçado, congelado**. Ciência e Tecnol. de Alimentos, v.19, n.2., maio/ago. 1999.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de janeiro: Fiocruz, 2003, 384p.

PHILIPPI, S.T. **Tabela de Composição de Alimentos: suporte para decisão nutricional**. Brasília:ANVISA, FINATEC/NUT-UnB. 2001. 133p.

PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica:Edur. 1998. 150p. Disponível em <www.sbfv.org.br/materialdidatico/download/Livropimentel.pdf> . Acesso em 26/10/2006.

PINHEIRO, A.B.; LACERDA, E.M.A.; BENZECRY, E.H.; GOMES, M.C.S.; COSTA, V.M. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. São Paulo: Editora Atheneu. 2000. 75p.

POOLE, N.D. & GRAY, K. **Quality in citrus fruit: to degreen or not degreen?** British Food journal, v.104,n. 7, 2002.p. 792-505.

PUSSEMIER, L.; LARONDELLE, Y.; PETEGHEM, C.V.; HUYGHEBAERT, A.; **Chemical safety of conventionally and organically produced foodstuffs: a tentative comparison under Belgian conditions**. Food Control, v.17, 2005, p.14-21.

REGANOLD, J. P.; **Effects of alternative and conventional farming systems on agricultural sustainability**. Food & Fertilizer Technology Center – An International Information center for farmers in the Asia Pacific Region. 1992. Disponível em http: <www.agnet.org/library/article/bc44001.html>. Acesso em 03/09/2005.

REIJNTJES, C. HAVERKORT, B. WATERS-BAYER, A.; **Agricultura para o futuro: uma introdução á agricultura sustentável e de baixo uso de insumo externos**. Rio de Janeiro: ASPTA, 1994, 324p.

ROIG, M.G.; BELLO, J.F.; RIVERA, Z.S.; KENNEDY, J.F.; **Studies on the occurrence of non-enzimatic browning during storage of citrus juice**. Food Research International, v.32, 1999, p. 609-619.

SALSA, J. **Cloroplasto**. CienTIC. 2004. Disponível em <http://www.cientic.com/imagens/cloroplasto3.jpg>. Acesso em 27/01/2007.

SETZER, V.W.; **O que é Antroposofia?** Sociedade Antroposófica no Brasil, 2005. Disponével em < http://www.sab.org.br/antrop/antrop.htm>. Acesso em 20 out 2005.

SHEUNG, K.S.M.; MIN, S.; SASTRY, S.K.; **Dynamic headspace analyses of orange juice flavour compounds and tehir adsortion into packaging materials.** J.Food Sci., v.69, n.7, 2004, p. 549 – 556.

SIN, H. N.; YUSOF, S.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; ABD. RAHMAN, R. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. Journal

o Food Engineering, v. 73, 2006, p. 313-319.

SMIRNOFF, N. & WHEELER, G.L. Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. Carbohydrate Research, v. 326, 2000, p.277–294.

VÍQUEZ, F.; LASTRETO, C. & COOKE, R. D. **A study of the production of clarified banana juice using pectinolytic enzymes**. Journal of Food Technology, v.16, 1981, p. 115-125.

YAPO, B.M.; LEROUGE, P.; THIBAULT, J.; RALET, M.; **Pectins from citrus pell cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II**. Carbohydrate Polymers, 2007, doi:10.1016/j.carbopol.2006.12.024.

ZHAN, D.; JANSSEN, P.; MORT, A. J. **Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin**. Carbohydrate Research, v. 308, 1998, p. 373-380.

ZIENA, H.M.S.; Quality attributes of B earss Seedless lime (Citrus latifolia Tan) juice during storage. Food Chemistry, v.71, 2000, p.167-172.