



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIELA SOARES VIANA

**Lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. *Tahiti*, de cultivos
convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da
capacidade antioxidante dos sucos *in natura* e clarificados por
membranas de microfiltração.**

Rio de Janeiro

2010

DANIELA SOARES VIANA

Lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. *Tahiti*, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos *in natura* e clarificados por membranas de microfiltração.

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientadoras:

Prof^a. Dr.^a Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Prof^a. Dr.^a. Gisela Maria Dellamora Ortiz

Rio de Janeiro

2010

DANIELA SOARES VIANA

Lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. *Tahiti*, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos *in natura* e clarificados por membranas de microfiltração.

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ___/___/2010

Orientadores

Presidente, Professora Dr^a. Lucia Maria Jaeger de Carvalho
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Dr^a. Gisela Maria Dellamora Ortiz
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora

Professora Dr^a. Mirian Ribeiro Leite Moura
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Dr^a. Mônica Freiman de Souza Ramos
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Dr^a. Suzana Caetano da Silva Lannes
Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo (USP)

Membros Suplentes

Professora Dr^a. Maria de Lourdes Giada
Instituto de Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Dr^a. Suzana Guimarães Leitão
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

DEDICATÓRIA

Aos meus grandes amores, meu pai Paulo Alves Viana, minha mãe Maria de Fátima Soares Viana, e meu marido Marcus Novaes de Souza.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, o criador do céu e da terra, POR TUDO, por ter me dado saúde, paz e energia, perseverança e felicidade para que eu pudesse alcançar meus objetivos e concretizar meu sonho.

À Professora Lucia Jaeger, muitas vezes orientadora, outras vezes mãe, mas sempre amiga. Obrigada pelo carinho, pela confiança e por seus valiosos conhecimentos, que foram acima de tudo fundamentais para minha caminhada.

Quero tê-la sempre em meu coração!!! Lucia a você: muito obrigada por tudo!!!

À Professora Gisela Maria Dellamora Ortiz, pela orientação e carinho. Obrigada pela oportunidade e pela confiança!!!

Ao pesquisador José Luiz Viana de Carvalho (EMBRAPA), pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho, principalmente pela confiança que depositaste em mim. Obrigada pelo carinho!!!

Aos meus adorados pais, Paulo Alves Viana e Maria de Fátima Soares Viana, pelo imenso e inigualável amor, pelo carinho e dedicação, pela educação que recebi e pela oportunidade que sempre me deram de estudar e crescer profissionalmente. Pessoas-chaves de minha formação, exemplos de vida, doação, humildade, fortaleza, religiosidade, união e amor. Amo vocês!

Ao Marcus Novaes de Souza, meu marido, amigo, companheiro e cúmplice. Por sua presença, pela paz infinita, força e empenho em cada momento desta batalha, estando ao meu lado com todo seu amor, compreensão e paciência, me dando força e apoio em todos os momentos. Muito obrigada. Te amo!

À amiga Renata Borchetta Fernandes Fonseca, por sua atenção e carinho, muitas vezes me orientou, me ajudou e esteve sempre ao meu lado torcendo pela minha vitória.

À amiga brasileira, Ediane Maria Gomes Ribeiro, que com todo seu jeitinho paciente me conquistou e cativou eternamente, estando sempre ao meu lado, me ajudando, ouvindo e aconselhando, dividimos momentos únicos, muitos deles difíceis, outros imensamente felizes, que iremos guardar em nossos corações e nossas recordações. Muito obrigada!!! Você estará sempre em meu coração!!!

À amiga Maria Cristina Reis Mansur, por todos os dias de alegria, de dificuldades e de perseverança, estando sempre presente em minha caminhada, dividindo conhecimentos, afeto e muita generosidade. Obrigada por tudo!!! Você será sempre minha segunda mãezinha!!!

Às Professoras Mirian Ribeiro e Nancy dos Santos Barbi, pela imensa paciência, alegria e simpatia, pela parceria, amizade e por todos os ensinamentos.

À Professora Maria de Lourdes Giada, que se mostrou sempre muito prestativa e amiga, disponibilizando todo seu conhecimento e sua infinita paciência, para a finalização desta tese.

Às minhas amigas Patrícia e Ana Cristina e a todos do laboratório LABCBROM: Ângelo, Cláudia, Isaias, Rafaela, Ana Carolina, Lara, Larissa e, ao amigo Jorginaldo Oliveira.

Às queridas tias e amigas, Rosa e Lucinha, por todo carinho, apoio e amizade. Estiveram sempre presentes na minha vida, torcendo por mim e me apoiando, com palavras amigas, gestos inexplicáveis e um eterno cuidado.

“Ainda que eu fale a língua dos homens e dos anjos se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. E ainda que eu distribuísse a todos os meus bens entre os pobres, ainda que entregasse meu corpo para ser queimado, se não tiver amor nada disso me adiantaria. O amor é paciente e bondoso. O amor não é ciumento, nem orgulhoso, nem vaidoso, nem egoísta. Não se alegra com a injustiça, mas se alegra com a verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais acaba: havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciências, passará. Agora, pois permanecem a fé, a esperança e o amor. Porém o maior destes é o amor.”

(I CORÍNTIOS 13: 1-3-4-6-7-8)

RESUMO

Lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. *Tahiti*, de cultivos convencional e orgânico biodinâmico: avaliação da capacidade antioxidante dos sucos *in natura* e clarificados por membranas de microfiltração.

A lima ácida destaca-se no Brasil como uma das frutas cítricas de maior importância comercial, sendo o segundo maior produtor e exportador. Os processos com membranas têm sido aplicados na clarificação de sucos e outros produtos por utilizarem baixas temperaturas, promover a esterilidade comercial a frio, preservando a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos. O objetivo do estudo foi avaliar a capacidade antioxidante dos sucos de lima ácida de cultivos convencional e orgânico biodinâmico, integrais e clarificados por microfiltração e suas características físicas e químicas. Utilizou-se membrana tubular de polietersulfona (0,3 μm), a pressões de 0,5; 1,0 e 2,0 Bar, para estabelecer a melhor na clarificação dos sucos. Foram realizadas análises físicas, químicas, instrumentais, microbiológicas, atividade antioxidante e polifenóis totais. O rendimento médio em suco clarificado convencional foi de 75%. Os fluxos médios nas pressões 0,5; 1,0 e 2,0 Bar foram de 49; 47 e 35 $\text{L}/\text{m}^2\cdot\text{h}$, respectivamente. O fluxo médio do processo a 0,5 Bar, com suco biodinâmico foi de 50 $\text{L}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ e rendimento em suco clarificado de 73%. Foram observadas perdas de pH, acidez e sólidos solúveis, em ambos os sucos clarificados (convencional e biodinâmico). A qualidade microbiológica dos sucos clarificados foi preservada após a MF. Pela análise do CE_{50} e pelo ABTS o suco biodinâmico integral apresentou melhor atividade antioxidante, seguido pelo convencional integral, convencional e biodinâmico clarificados. Os polifenóis nos sucos clarificados foi 78 e 79,6% (biodinâmico e convencional) sendo sua aparência translúcida, coloração verde-claro, aspecto atrativo e, com a capacidade antioxidante preservada.

ABSTRACT

Acid lime (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, conventional and biodynamic organic farming: evaluation of the antioxidant capacity of fresh juices and clarified by microfiltration membranes.

The acid lime in Brazil stands out as one of the citrus fruits of most commercial importance, being the second largest producer and exporter. The membrane processes have been applied in the clarification of juices and other products for using low temperatures, promoting commercial cold sterility, preserving the nutritional and sensory quality of foods. The aim of this study was to evaluate the antioxidant capacity of acid lime juice of conventional and organic biodynamic grows, full and clarified by microfiltration and its physical and chemical characteristics. It was used tubular polyethersulfone membrane (0.3 μm) at pressures of 0.5, 1.0 and 2.0 Bar, to establish the better clarification of juices. Were accomplished physical, chemical, instrumental, microbiological analyses of antioxidant activity and total polyphenols. The average profit in conventional clarified juice was 75%. Average flows at the pressures 0.5, 1.0 and 2.0 Bar were 49, 47 and 35 $\text{L}/\text{m}^2\cdot\text{h}$, respectively. The average flow of the process to 0.5 Bar with biodynamic juice was 50 $\text{L}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ and clarified juice's profit was 73%. Were observed losses in pH, acidity and soluble solids in both clarified juices (conventional and biodynamic). The microbiological quality of clarified juice was preserved after MF. By analysis of CE_{50} and ABTS, the biodynamic full juice showed better antioxidant activity, followed by full conventional, conventional and biodynamic clarified. The polyphenols in clarified juices was 78 and 79.6% (biodynamic and conventional) and its appearance was translucent, light green color and attractive aspect, with antioxidant capacity preserved.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Árvore de <i>Citrus latifolia</i> Tanaka, cv. <i>Tahiti</i> | 18 |
| Figura 2 – Folhas e frutos de <i>Citrus latifolia</i> Tanaka, cv. <i>Tahiti</i> | 19 |
| Figura 3 – Fruto de <i>Citrus latifolia</i> Tanaka, cv. <i>Tahiti</i> | 19 |
| Figura 4 – Flor de <i>Citrus latifolia</i> Tanaka, cv. <i>Tahiti</i> | 20 |
| Figura 5 – Esquema da capacidade de separação das membranas de MF e UF..... | 38 |
| Figura 6 – Fluxograma do procedimento de obtenção dos sucos de lima ácida..... | 46 |
| Figura 7 - Sistema de microfiltração (PROTOSEP IV KOCH)..... | 47 |
| Figura 8 – Estrutura química do radical DPPH..... | 51 |
| Figura 9 – Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio..... | 52 |
| Figura 10 – Suco de lima ácida orgânica biodinâmica integral e clarificado..... | 59 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Produção e exportação de limão e lima ácida no Brasil..... | 21 |
| Tabela 2 - Rendimento dos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica.... | 55 |
| Tabela 3 - Fluxo hidráulico da membrana em diferentes pressões aplicadas..... | 56 |
| Tabela 4 - pH, sólidos solúveis e acidez titulável nos sucos LC e LB integrais e clarificados a 0,5 Bar..... | 60 |
| Tabela 5 - Composição centesimal dos sucos LC e LB integrais e clarificados..... | 62 |
| Tabela 6 - Qualidade microbiológica dos sucos LC e LB integrais e clarificados..... | 64 |
| Tabela 7 - Atividade antioxidante ($\% \pm DP$) dos sucos LC e LB integrais e clarificados pelo método DPPH..... | 66 |
| Tabela 8 - Coeficientes de determinação (R^2) e CE_{50} dos sucos LC e LB integrais e clarificados e do padrão Trolox | 67 |
| Tabela 9 - Atividade antioxidante total (AAT) dos sucos LC e LB integrais e clarificados pelo método ABTS..... | 72 |
| Tabela 10 - Conteúdo total de polifenóis (EAG) nos sucos LC e LB integrais e clarificados..... | 77 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Comportamento do fluxo em função do tempo nas diferentes pressões (0,5; 1,0 e 2,0 Bar) com o suco de lima ácida convencional..... | 57 |
| Gráfico 2 - Comportamento do fluxo em função do tempo nos três processos com suco de lima ácida orgânica biodinâmica a 0,5 Bar..... | 58 |
| Gráfico 3 - Distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida convencional integral..... | 63 |
| Gráfico 4 - Distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida orgânica biodinâmica integral..... | 64 |
| Gráfico 5 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida convencional integral em relação ao padrão Trolox no ensaio DPPH..... | 69 |
| Gráfico 6 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida convencional clarificado em relação ao padrão Trolox no ensaio DPPH..... | 69 |
| Gráfico 7 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco LB integral e do padrão Trolox pelo método DPPH..... | 70 |
| Gráfico 8 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco LB clarificado e do padrão Trolox pelo método DPPH..... | 71 |
| Gráfico 9 - Atividade antioxidante total dos sucos LC integral e clarificado pelo método ABTS..... | 73 |
| Gráfico 10 - Atividade antioxidante total dos sucos LB integral e clarificado pelo método ABTS..... | 73 |
| Gráfico 11 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida convencional integral em relação ao padrão Trolox no ensaio ABTS..... | 74 |
| Gráfico 12 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida convencional clarificada em relação ao padrão Trolox no ensaio ABTS..... | 75 |
| Gráfico 13 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida orgânica biodinâmica integral em relação ao padrão Trolox no ensaio ABTS..... | 75 |
| Gráfico 14 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida orgânica biodinâmica clarificado em relação ao padrão Trolox no ensaio ABTS..... | 76 |
| Gráfico 15 - Curva padrão de ácido gálico..... | 77 |
| Gráfico 16 - Polifenóis totais nos sucos de lima ácida convencional (LC) integrais e clarificados a 0,5 Bar..... | 78 |
| Gráfico 17 - Polifenóis totais nos sucos LB integrais e clarificados..... | 78 |

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAO – Atividade Antioxidante

AAPH - 2,2'-azobis 2-amidinopropano dihidroclorídrico

AAT - Atividade Antioxidante Total

ABTS - ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato

AG – Ácido Gálico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists

A.P.H.A. - American Public Health Association

CPP – Contagem Padrão em Placas

cv. – Cultivar

DPPH - 2,2-difenil-1-picril hidrazil

EAG – Equivalentes de Ácido Gálico

FAO - Food Agriculture Organization

FRAP - Power Antioxidant of the Reducing Ferric

IBD – Instituto Biodinâmico

IFOAM - Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgânica

LB - Lima Ácida Orgânica Biodinâmica

LBC - Lima Ácida Orgânica Biodinâmica Clarificada

LBI – Lima Ácida Orgânica Biodinâmica Integral

LC – Lima Ácida Convencional

LCC - Lima Ácida Convencional Clarificada

LCI - Lima Ácida Convencional Integral

MF – Microfiltração

NMP – Número Mais Provável

ORAC - Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio

PES - polietersulfona

PIQ - Padrão de Identidade e Qualidade

PS - polisulfona

PTM – Pressão transmembrana

PVDF - polivinilideno

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária

TBA - ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS - substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

Trolox - ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano

UF – Ultrafiltração

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. Lima ácida (<i>Citrus latifolia</i> , Tanaka), cv. Tahiti | 17 |
| 1.2. Sistemas de Cultivo Orgânico Biodinâmico | 22 |
| 1.3. Certificação do Cultivo de Qualidade Orgânica | 25 |
| 1.4. Atividade Antioxidante e Compostos Fenólicos | 26 |
| 1.5. Processos com Membranas de Ultrafiltração e Microfiltração | 34 |
| 1.6. Tipos de Membranas Utilizadas em Processos de Microfiltração | 37 |
| 1.7. Clarificação de Sucos | 40 |
| 2. OBJETIVOS | 44 |
| 2.1. Objetivo geral | 44 |
| 2.2. Objetivos específicos | 44 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 3.1. Matéria-prima | 45 |
| 3.2. Amostragem | 45 |
| 3.3. Cálculos de Rendimento | 45 |
| 3.4. Obtenção dos Sucos | 45 |
| 3.5. Permeabilidade Hidráulica da Membrana do Sistema de MF | 46 |
| 3.5.1. Procedimento de Limpeza e Recuperação da Membrana | 47 |
| 3.5.2. Medição do Fluxo Hidráulico | 47 |
| 3.6. Processo de MF | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7. Composição Centesimal, Análises Físicas, Químicas, Instrumentais e Microbiológicas | 48 |
| 3.7.1. Determinação da Composição Centesimal dos Sucos | 48 |
| 3.7.2. Análises Físicas, Químicas, Instrumentais e Microbiológicas | 49 |
| 3.8. Determinação da Atividade Antioxidante | 50 |
| 3.8.1. Método DPPH | 50 |
| 3.8.2. Método ABTS | 52 |
| 3.9. Conteúdo de Polifenóis Totais | 53 |
| 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 54 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 55 |
| 5.1. Rendimento dos Sucos Integrais de LC e LB | 55 |
| 5.2. Permeabilidade Hidráulica da Membrana de MF | 56 |
| 5.3. Fluxos do Processo de MF com o Suco de Lima Ácida Convencional | 56 |
| 5.4. Fluxos dos Processos de MF com o Suco de Lima Ácida Orgânica Biodinâmica | 58 |
| 5.5. Análises Físicas, Químicas, Instrumentais, Microbiológicas e Composição Centesimal dos Sucos Integrais e Clarificados | 60 |
| 5.5.1. pH, sólidos solúveis, acidez titulável e composição centesimal | 60 |
| 5.5.2. Tamanho de Partículas | 62 |
| 5.5.3. Análises Microbiológicas | 64 |
| 5.6. Atividade Antioxidante | 66 |
| 5.6.1. Método DPPH | 66 |
| 5.6.2. Método ABTS | 72 |
| 5.7. Conteúdo de Polifenóis Totais | 76 |
| 6. CONCLUSÕES | 80 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 81 |

1. INTRODUÇÃO

Um aumento expressivo no consumo de alimentos orgânicos tem sido observado atualmente, em diversos países. Os principais fatores relacionados ao aumento no consumo e, conseqüente, demanda destes alimentos são a manutenção da saúde, a prevenção de doenças, a busca por uma melhor qualidade de vida e a preservação do meio ambiente (DAROLT, 2002).

Os consumidores de alimentos industrializados, têm se preocupado cada vez mais com a qualidade nutricional e sensorial do que consomem, aumentando a demanda por produtos nutritivos, saborosos e que não contenham conservantes químicos e resíduos de agroquímicos provenientes de seu cultivo (CIANCI *et al.*, 2005).

Em 1960, o interesse pela agricultura orgânica biodinâmica aumentou e, em 1978, criou-se o Instituto de Pesquisas de Agricultura Orgânica (IPAO), o qual compara e diferencia os sistemas biodinâmico, orgânico e convencional. O produto orgânico deve ser certificado, para ser considerado como tal, por não apresentar diferença aparente significativa quando comparado ao convencional (IFOAM, 2002).

O alimento orgânico biodinâmico apresenta alta qualidade biológica, sendo isento de substâncias nocivas à saúde humana, visando à sustentabilidade econômica, social, cultural e ambiental, proveniente do sistema de cultivo que observa as leis da natureza e todo o manejo agrícola está baseado no respeito ao meio ambiente (SDA, 1999).

Os principais países produtores de frutos cítricos, segundo a FAO (2008), são a China, o Brasil e os Estados Unidos, seguidos pelo México, Espanha e Itália. Entretanto, por espécie, o Brasil é, destacadamente, o primeiro produtor mundial de laranja e limão por plantio convencional, seguido pelos Estados Unidos, enquanto a China se destaca na produção de tangerinas.

A lima ácida, cv. *Tahiti* (*Citrus latifolia* Tanaka), conhecida como limão *Tahiti*, destaca-se no Brasil como uma das frutas cítricas de maior importância comercial, estimando-se que sua área plantada ultrapasse 30 mil hectares. De origem tropical, o limão *Tahiti* é considerado e conhecido como lima ácida. Cultivado desde o século passado na Califórnia (EUA), admite-se que sua introdução nesta região tenha sido feita a partir de sementes de frutos importados do Tahiti, justificando sua denominação (BARROS, 1986).

A lima ácida é rica em vitamina C, ácido fólico, niacina e piridoxina, além de possuir, em sua constituição, compostos fenólicos, entre outros compostos bioativos (substâncias com alto potencial antioxidante), o que caracteriza o grande interesse de diferentes grupos de pesquisa (CARVALHO, CASTRO & SILVA, 2008; CARVALHO E COL., 2006; COURI E COL., 2003; MARX E COL., 2003).

Segundo Dhuique-Mayer (2005), os compostos fenólicos e a vitamina C são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em frutos cítricos.

As exigências do mercado consumidor, em relação aos sucos de frutas clarificados, levam à investigação das suas características nutricionais e sensoriais pós-processo, uma vez que na clarificação de sucos com membranas de ultrafiltração (UF) e microfiltração (MF), com ou sem prévio tratamento enzimático, várias substâncias com valor nutricional, como vitaminas e minerais, entre outros, podem não ser recuperados no suco clarificado ou, ainda, serem retidos na polpa concentrada ou na superfície ou no interior dos poros das membranas (KOROKNAI *et al.*, 2008; CIANCI *et al.*, 2005; CARVALHO; SILVA; PIERUCCI, 1998; ITOUA-GASSAYE; DAVIN; MIETTON-PEUCHOT, 1991).

Perdas de constituintes são, normalmente, verificadas de acordo com o tamanho médio do poro das membranas utilizadas no processo de clarificação, bem como o tipo de polímero de sua composição, a temperatura do processo e as pressões utilizadas, entre outros fatores (CARVALHO; CASTRO; SILVA, 2008). Assim sendo, há que se investigar as perdas de nutrientes pós-processo a fim de que se possa viabilizá-los para aplicação em escala industrial.

O principal objetivo da presente dissertação foi avaliar a atividade antioxidante de sucos de lima ácida (*Citrus latifolia* Tanaka), cv. *Tahiti*, obtidos por cultivo convencional e orgânico biodinâmico, integrais e após sua clarificação por processos com membrana de microfiltração.

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

O limoeiro - tahiti é uma árvore perenifólia, quase sem espinhos, com ramos um tanto pêndulos, brotos novos arroxeados, atingindo altura variável de 4-6 metros (Figura 1). Possui folhas simples, coriáceas, glabras e lustrosas, de 3-7 cm de comprimento, com pecíolo alado (Figura 2), flores solitárias e botões levemente tingidos de púrpura, dispostos em racemos terminais curtos. Os frutos são ovóides ou oblongos (Figura 3),

pesando cerca de 70g, com curto mamilo no ápice, de casca com vesículas de óleo, polpa suculenta, firme e muito ácida (LORENZI *et al.*, 2006).

A lima ácida é um fruto pertencente à família *Rutaceae*, do gênero *Citrus* e da espécie *Citrus latifolia*. Seu crescimento e desenvolvimento para cultura não exige qualidade diferenciada de solo, produzindo tanto em terras de areia como em argila. É muito sensível ao frio, às geadas e às altas temperaturas, mais do que a laranjeira, a toranjeira e a tangerineira (LORENZI *et al.*, 2006).

Em sua grande maioria, os frutos contêm grande quantidade de suco contendo elevados teores de ácido cítrico, vitamina C e sais minerais, além de pectina na entrecasca e óleos essenciais constituídos principalmente por monoterpenos na casca, sendo um grande atributo às propriedades terapêuticas (BARROS, 1986).

Dividi-se em três partes, denominadas epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O epicarpo é a parte externa ou camada exterior, na qual existem cromoplastídeos que conferem a cor característica e câmaras secretórias que contêm óleos essenciais, utilizados na fabricação de perfumes, aromatizantes, entre outros produtos. A segunda parte é o mesocarpo ou albedo, de tecido esponjoso e branco. Por último, encontra-se o endocarpo ou polpa que é constituído por vesículas contendo o sumo, envolvido por uma membrana transparente (COELHO, 1993).



Figura 1 – Árvore de *Citrus latifolia* Tanaka, cv. *Tahiti* (Fazenda Bom Jesus, município de Santa Rita do Passa Quatro, SP, Julho, 2009).



Figura 2 – Folhas e frutos de *Citrus latifolia* Tanaka, cv. *Tahiti* (Fazenda Bom Jesus, município de Santa Rita do Passa Quatro, SP, Julho, 2009).

Esse cultivar cítrico tem como característica apresentar, nas regiões tropicais, fluxos de crescimento e de floração contínuos, interrompidos por períodos de déficit hídrico, o que pode ser minimizado com as novas técnicas de cultivo irrigado. Sendo considerada ainda, como uma das espécies de *citrus* de maior precocidade, apresentando, já a partir do terceiro ano, uma produção significativa (COELHO, 1993).



Figura 3 - Fruto de *Citrus latifolia* Tanaka, cv. *Tahiti* (LORENZI *et al.*, 2006).

As vantagens desta variedade são o seu sabor e a ausência de sementes, devido a sua constituição genética triplóide, produzindo pólen não viável. A coloração externa da casca é um dos principais atributos de qualidade e um fator determinante na comercialização de limão (MAZZUZ, 1996).

As florações mais abundantes ocorrem entre setembro e outubro sendo os picos de produção concentrados entre janeiro e junho. A colheita do fruto deve ser realizada de 120 a 160 dias após a florada (Figura 4), quando estiver bem desenvolvido, porém ainda verde (CRUZ *et al.*, 2008).



Figura 4 – Flor de *Citrus latifolia* Tanaka, cv. *Tahiti* (Fazenda Bom Jesus, município de Santa Rita do Passa Quatro, SP, Julho, 2009).

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, a lima ácida adapta-se, exclusivamente, em climas tropicais, embora se adapte a diferentes tipos de solo, sendo o México e o Brasil os seus maiores produtores (FAO, 2008).

A produção brasileira de limão no período de 1992 a 1998 ultrapassou um pouco mais de 600 mil toneladas para mais de 700 mil toneladas em 46.554 hectares de área cultivada, com incremento de 4,5 mil ha no período (GUARDIOLA e GARCIA-LUIS, 1998).

O aumento da produção de limão Tahiti levou à exploração de novos mercados, especialmente aqueles da Europa que, com rapidez, aceitaram o novo limão de "casca verde". Desde tempos ancestrais os limões eram utilizados na alimentação dos povos do ocidente, como condimento e aromatizante na culinária e, ainda, por seus conhecidos benefícios medicinais. A prevenção e cura do escorbuto, doença causada pela ausência na alimentação de frutas e verduras frescas (falta de vitamina C) transformou os limões em exigência imperativa nas viagens marítimas (CRUZ *et al.*, 2008).

A estimativa de produção no Brasil para o limão e lima ácida, em 2010, é de 24,062 milhões de toneladas (Tabela 1) em torno de 11% superior à produção, entre o período de 2002 a 2005 (FAO, 2008).

Tabela 1- Produção e exportação de limão e lima ácida no Brasil (FAO, 2008).

| Ano | Produção (t) | Exportação (t) |
|-------------|-------------------------|---------------------------|
| 2002 | 984.551 | 21.800 |
| 2005 | 1.031.531 | 44.300 |
| 2008 | 12.560.320 | 58.670 |
| 2010 | 24.000.062 | 96.380 |

O Brasil é o segundo maior produtor de frutos cítricos, principalmente laranja e limão, e seu maior exportador, sendo o Estado de São Paulo o primeiro produtor de limão ou lima ácida, cv. *Tahiti*, com participação em 81,3% da produção seguidos pelo Rio de Janeiro e Bahia, com 3,9 e 2,7%, respectivamente (MENDONÇA *et al.*, 2006).

A lima ácida é utilizada *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, 2008).

Segundo Ziena (2000), o suco de lima é amplamente consumido, em diferentes aplicações, onde se destaca o uso como condimento, aromatizante (especialmente em alimentos cozidos e servidos quentes e, também, em saladas), como acidulante e na fabricação de limonadas. É utilizado, ainda, para prevenir o escurecimento em frutas frescas utilizadas em xaropes e em conservas vegetais pela presença de ácido cítrico.

Os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ's) preconizados pela legislação brasileira, definem o suco de limão como: "bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do limão (*Citrus limon*, L., Burn), através de processo tecnológico

adequado”. Estabelecem, ainda, a composição e as características correspondentes ao produto, devendo conter teor mínimo de 5,0 g (ácido cítrico g/100g) para acidez titulável, mínimo de 20 mg de ácido ascórbico (ácido ascórbico/100mg) e teor máximo de 0,025 (%v/v) de óleo essencial de limão (BRASIL, 2000).

1.2. Sistemas de Cultivo Orgânico Biodinâmico

A agricultura orgânica abrange um amplo e variado espectro de práticas agrícolas, adaptáveis conforme a realidade local, sempre de acordo com princípios ecológicos e biologicamente corretos. Todas as práticas indispensáveis à agricultura orgânica são igualmente indispensáveis à agricultura biodinâmica. Para a agricultura orgânica, porém, são dispensáveis algumas das práticas obrigatórias para o reconhecimento da qualidade biodinâmica, estabelecidas nas diretrizes para o Padrão de Qualidade Demeter (IBD, 2009).

A totalidade e a essência da agricultura biodinâmica e da orgânica não se resumem em normas, pois exigem respostas sempre novas às diferentes situações em que forem realizadas. Mesmo assim, existe a necessidade de se definir um padrão mínimo, a partir do qual um produto possa ser considerado como orgânico ou biodinâmico - possibilitando clareza, entendimento e confiança entre os produtores e consumidores (IBD, 2009).

Dentre os cultivos orgânicos inclui-se a agricultura biodinâmica, desenvolvida pelo filósofo austríaco, Rudolf Steiner em 1924, que a definiu como “um caminho de conhecimento para guiar o espiritual do ser humano ao espiritual do universo”. De uma forma geral, não se trata de práticas fixas e obrigatórias, mas de uma forma de abordar a atividade agrícola e a ciência da agricultura que conduzirá a respostas diferenciadas e adequadas quando aplicada às diversas situações de cultivos locais, sendo necessário manter constante observação e aprendizado, principalmente em relação à natureza e suas modificações no tempo (IBD, 2009).

A agricultura surgiu por volta de 10 mil anos para a produção de alimentos. Apesar das diferenças entre os ecossistemas, onde houve o estabelecimento da agricultura, a nutrição vegetal era baseada em processos biológicos como a incorporação de animais e resíduos vegetais no solo (BORGES *et al.*, 2003).

A introdução e o desenvolvimento da química, juntamente com o desenvolvimento industrial, propiciaram o surgimento de um modelo de agricultura centrado no uso de insumos químicos (desenvolvido por Liebig, em 1840), cultivo e

colheita mecanizados e sementes melhoradas, sendo denominada de agricultura convencional (BORGES *et al.*, 2003).

O cultivo convencional deve ser questionado e repensado, uma vez que se reporta a utilização exaustiva do solo com adição de adubos minerais de alta solubilidade, na utilização de agroquímicos para o controle de pragas e ervas daninha, em cultivares de alta resposta a fertilizantes e agrotóxicos químicos sintéticos. Engloba um pacote tecnológico dependente de insumos industrializados demandando alto consumo energético, gerando impacto negativo no meio ambiente e na saúde do ser humano (DAROLT, 2003).

Tratar o solo como um organismo vivo é oferecer a oportunidade de que agricultores, no futuro, possam produzir e desenvolver suas terras e colheitas de forma saudável, associadas ao baixo custo, pelo uso de insumos disponíveis no próprio ambiente (compostagem), o que faz deste cultivo uma alternativa atraente, visto que, dependendo da cultivar ou matéria-prima, 80% dos custos são devido à aquisição de agroquímicos, caracterizando seu papel importante e gradativo na substituição do cultivo convencional (IFOAM, 2002).

Os alimentos orgânicos apresentam diferentes atrativos, por serem cultivados com insumos biológicos, respeitando o meio ambiente e as relações sociais, e preservam em si as qualidades do ambiente equilibrado, pelos quais foram cultivados. As características peculiares do clima, a fertilidade natural do solo, a pureza das águas que compõem estes alimentos são alguns elementos que, ordenados pela mão consciente do agricultor orgânico, resultam em alimentos mais compatíveis com a natureza viva do organismo humano, pois mantêm sua pureza, vitalidade, equilíbrio e valor nutritivo (IBD, 2009).

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

Darolt (2005) agrupa o sistema orgânico em quatro grandes vertentes: agricultura biodinâmica, biológica, orgânica e natural. 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.

Para alguns autores (BORGES *et al.*, 2003; ALTIERE, 2002; CHARITY, 2001), no cultivo orgânico o manejo do solo, considerado uma das práticas mais importantes, deve ser direcionado, mantendo-o coberto, com matéria viva e/ou morta, utilizando adubos verdes e diferentes compostos. A aplicação de adubos orgânicos em solos tropicais proporciona melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas, obtendo-se boas respostas das plantas, devido principalmente a fertilização do solo.

As preparações do adubo biodinâmico e sua pulverização, criadas a partir de substâncias naturais e orgânicas são aplicadas em pequenas doses a fim de melhorar e regular o crescimento vegetal, a vida do solo e todo o metabolismo, através do ciclo biológico.

O método de produção no cultivo biodinâmico envolve a aplicação de matéria-prima vegetal (flores de camomila, casca de madeira triturada e outros tipos de flores), esterco de gado ou quartzo moído introduzindo em partes selecionadas de matéria orgânica animal, fermentadas no solo, em um período de quatro a seis meses (IBD, 2009).

Quando o processo fermentativo se completa, o material da preparação é separado do material orgânico, o qual será distribuído para ser utilizado em pequenas porções. Com isso, o material mais utilizado na produção biodinâmica é o esterco em compostagem, em torno de 70% sendo, portanto, o produto orgânico biodinâmico considerado como aquele cultivado com uso de compostos biodinâmicos elaborados a partir de ervas medicinais e esterco (BORGES *et al.*, 2003).

A produção de frutas adequadas à obtenção de sucos cítricos, a exemplo da lima ácida, cv. *Tahiti*, por meio de cultivos não convencionais como o cultivo orgânico biodinâmico (GLIESSMAN, 2000; ELHERS, 1996) pode vir a apresentar variações, devido à forma de cultivo, na sua composição nutricional, quanto aos teores de açúcares, ácido ascórbico, acidez, substâncias voláteis, entre outras substâncias, o que poderá gerar sucos com maior teor de nutrientes.

Diferentes estudos demonstram que os alimentos orgânicos são melhores para a saúde do que os convencionais. Uma pesquisa realizada pela Universidade de Newcastle, no Reino Unido, com financiamento da União Européia, indica que frutas e vegetais orgânicos possuem, em relação aos seus similares não orgânicos, até 40% mais antioxidantes, substâncias relacionadas à diminuição dos riscos de câncer e de doenças cardiovasculares e circulatórias (IBD, 2009).

1.3. Certificação do Cultivo de Qualidade Orgânica

Diretrizes de qualidade são utilizadas em diversos países, tanto para produtos orgânicos em geral (Normas da IFOAM – International Federation of Organic Agriculture Movements/ Federação Internacional de Movimentos de Agricultura Orgânica) quanto para produtos biodinâmicos (Demeter Internacional). Na prática, usam-se os Selos de Qualidade (marca específica de cada produtor) para indicar a concordância com as Diretrizes, que são atestadas por certificadoras competentes (IBD, 2009).

Devido à importância de manter a qualidade da produção, a confiança do consumidor e a manutenção da biodiversidade, surgiu a necessidade de padronizar produtos e processos, garantindo a ética da produção, surgindo assim, as certificações. Segundo Darolt (2003), certificação são a definição de atributos de um produto, processo ou serviço e a garantia de que eles se enquadram em normas pré-definidas, além do controle da procedência do produto, garantindo sua rastreabilidade e sua qualidade.

O sistema de certificação desempenha um papel fundamental na formação dessa importante imagem mercadológica, com base na rastreabilidade e regras internacionais. Um grupo pequeno de produtores se dedica a estas atividades, por isso a produção de produtos orgânicos ainda não é capaz de suprir todo o mercado consumidor (CARRIJO e ROCHA, 2002).

A garantia da qualidade é mantida desde o preparo do solo, passando por todas as práticas de manejo das culturas até o processamento e consumo. Todos esses processos seguem normas rígidas específicas para produtos orgânicos estabelecidas pelas instituições certificadoras nacionais e/ou internacionais (IBD, 2009).

A forma mais precisa e confiável, até o momento, para que o consumidor constate que um alimento foi produzido pelo sistema orgânico ou orgânico biodinâmico, é o selo de qualidade fornecido por entidades nacionais e internacionais, como por exemplo, o Instituto Biodinâmico (IBD), organização que desenvolve atividades de certificação de produtos orgânicos e biodinâmicos, instituída em 1991 (DAROLT, 2003).

O selo de qualidade orgânica é um indicativo de que os alimentos foram produzidos e processados de acordo com as diretrizes e normas do cultivo orgânico, resultando positivamente na qualidade agrônômica quando comparado ao alimento de cultivo convencional, além de oferecer segurança e confiabilidade aos consumidores, no

sentido de que os alimentos não foram submetidos a radiações ionizantes e que não possuem organismos geneticamente modificados (OGM's) ou transgênicos na sua composição. Portanto, o cultivo (sem pesticidas, fertilizantes e/ou agentes químicos) acrescido do certificado de qualidade do Instituto Biodinâmico (IBD) garante a forma biodinâmica de agricultura (IBD, 2009; DAROLT, 2003).

Somente poderão utilizar o selo “IBD CERTIFICAÇÕES ORGÂNICO” em suas embalagens os produtos que contiverem, no mínimo, 95% de ingredientes de origem agropecuária - orgânicos certificados (IBD, 2009).

De acordo com Stringheta e Muniz (2003) a característica mais marcante desse cultivo é a utilização dos preparados biodinâmicos, além de ter um sistema próprio de certificação, fiscalização e credenciamento de produtores com reconhecimento mundial, diferenciam-se dos demais métodos de produção não convencionais em diferentes pontos:

- ▶ Interligação e interdependência da propriedade agrícola com a fauna, flora, solo, cursos d'água e o ser humano;
- ▶ Harmonia com o meio ambiente promovida pelo equilíbrio paisagístico e ecológico (plantação de árvores, entre outros) e a recuperação de áreas com flora nativa;
- ▶ Interação entre produção vegetal e animal e aproveitamento dos resíduos na elaboração de compostos dentro da propriedade agrícola;
- ▶ Obediência ao calendário astrológico (cósmico) na semeadura e demais atividades agrícolas;
- ▶ Utilização de preparados biodinâmicos à base de extratos vegetais e de soluções orgânicas e minerais, que incorporados às pilhas de compostagem ou aplicados diretamente sobre o solo e as plantas, possuem ótimo efeito sobre a natureza.

A legislação brasileira emprega o termo orgânico no sentido genérico, para designar produtos provenientes de vários métodos ou sistemas de manejo agrícola. Os alimentos orgânicos têm sido mundialmente escolhidos, por agregar qualidade aos produtos e por oferecerem segurança de saúde aos seus consumidores, reduzindo a elevada incerteza sobre contaminações por substâncias tóxicas, cancerígenas ou que possam provocar qualquer tipo de dano à saúde humana (DAROLT, 2003).

1.4. Atividade Antioxidante e Compostos Fenólicos

Os antioxidantes são considerados um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos extratos oxidáveis, inibem ou

retardam, através de um ou mais mecanismos, os processos oxidativos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000). Podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde humana sendo divididos em: enzimáticos, solúveis, nutricionais e sequestradores de metais de transição (VAYA e AVIRAM, 2001).

Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e, entre os naturais, destacam-se o ácido ascórbico, a vitamina E e o β -caroteno (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Quanto à solubilidade, os antioxidantes podem ser fisicamente classificados em dois grupos: antioxidantes hidrofílicos, tais como a vitamina C e a maioria dos compostos fenólicos; e antioxidantes lipofílicos, principalmente a vitamina E, e os carotenóides. Ambos exercem um papel importante no extenso espectro de processos bioquímicos e fisiológicos (HUANG *et al.*, 2002).

Os radicais livres são espécies químicas, geralmente muito reativas, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. São produzidos continuamente nas células como produtos intermediários do metabolismo. Os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas são o O_2 e seus radicais (CLARO, 2002).

A produção excessiva destes radicais no organismo humano vem sendo associada ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas e neurológicas, ou como um potente acelerador do processo de envelhecimento (KOLEVA *et al.*, 2002; CHRISTEN, 2000; JIMENEZ, RINCÓN, PULIDO, 2000).

Estes radicais livres são produtos celulares resultantes do processo de utilização do oxigênio, possuem vida curta, mas podem se tornar estáveis e, causar reações químicas lesivas reversíveis e até irreversíveis às mesmas células. Ocorrem em quantidade reduzida nas condições normais e o corpo humano possui substâncias que reparam as consequências destas ligações em sua grande maioria, que são os antioxidantes, considerados antídotos dos radicais livres agindo de diferentes modos para evitar estes danos (WETTASINGHE *et al.*, 2002).

Estão em permanente atividade no organismo e, quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e sua correspondente neutralização pelos antioxidantes, ocorre o que se denomina “estresse oxidativo” (GIASSON, 2002; MCCORD, 1994).

Fatores externos também contribuem para a formação destes radicais livres, como por exemplo o tabagismo, etilismo, sedentarismo, ingestão de gorduras saturadas, pouca ingestão de fibras presentes em frutas e verduras, stress, entre outros (DIAZ, FREI, KEANEY, 1997).

A predisposição genética, fatores ambientais como radiação ultravioleta (UV) e propriedades intrínsecas específicas de grupos celulares podem exacerbar o dano oxidativo ou diminuir a capacidade das células de degradar estes agentes agressores (GIASSON, 2002).

A oxidação é uma reação que ocorre também nos alimentos, provocando a perda de seu valor nutritivo e sensorial, através da decomposição dos ácidos graxos e, a formação de compostos que podem reagir com outros componentes dos alimentos (MATHEW, ABRAHAM, 2005).

Para evitar o desenvolvimento da reação oxidativa, os antioxidantes são empregados como aditivos alimentares. Dentre os antioxidantes sintéticos bastante utilizados pelas indústrias alimentícias, incluem-se: o butil-hidroxi-tolueno (BHT), o butil-hidroxi-anisol (BHA) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (MARINOVA e YANISHILIEVA, 2003).

Frutas e vegetais são a principal fonte de antioxidantes naturais na dieta humana e estão associados a baixos riscos de doenças cardiovasculares, diabetes, deficiência do sistema imunológico, entre outros (HARBONE e WILLIAMS, 2000).

Estudos epidemiológicos sugerem uma associação positiva entre o consumo de alimentos com propriedades antioxidantes e seu possível papel na prevenção de doenças crônico-degenerativas, enfermidades cardiovasculares e circulatórias (STOCLET *et al.*, 2004), cancerígenas (KATSUBE *et al.*, 2003), no diabetes e no mal de Alzheimer (ABDILLE *et al.*, 2005; ISHIGE, SCHUBERT e SAGARA, 2001).

Os frutos cítricos possuem sabor e aroma agradáveis e na sua composição encontram-se nutrientes essenciais e micronutrientes como vitaminas e minerais, além das fibras (MORTON *et al.*, 2000; PELLEGRINI *et al.*, 2003). Sabe-se também que a vitamina C, os compostos fenólicos e os carotenóides presentes em alguns frutos cítricos apresentam capacidade em captar radicais livres, caracterizando sua atividade antioxidante (DHUIQUE-MAYER, 2005; HARBONE e WILLIAMS, 2000).

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, principalmente dos sucos de frutas, é importante para avaliar a proteção contra a oxidação e posterior deterioração, sendo que estas reações podem levar à redução da qualidade nutricional do

alimento, através da decomposição dos ácidos graxos e a formação de compostos que podem reagir com outros componentes dos alimentos e também serem prejudiciais para o organismo humano (JARDINI e MANCINI-FILHO, 2007).

Um bom antioxidante natural depende de diversos fatores, que incluem a presença de substituintes de doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função do seu potencial de redução; a capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; a capacidade de quelação de metais de transição envolvidos no processo oxidativo e o acesso ao local de ação, dependendo da sua propriedade hidrofílica ou lipofílica e de seu coeficiente de partição (MANACH *et al.*, 2004; MOURE *et al.*, 2001).

Jardini e Mancini-Filho (2007) avaliaram a atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e das sementes de romã, concluindo que o fruto apresenta atividade antioxidante elevada, verificada pela presença de compostos fenólicos e compostos com capacidade redutora e os extratos aquosos da polpa e das sementes foram os mais eficazes na atividade antioxidante.

Dos Santos *et al.* (2008) demonstraram que as polpas de açaí apresentaram elevados valores na sua capacidade antioxidante, sendo as antocianinas e os compostos fenólicos totais os responsáveis pela correlação positiva e significativa com sua atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Por outro lado, são essenciais na fisiologia e metabolismo celular, estando envolvidos em várias funções nas plantas, tais como propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e adstringência), estrutura, polinização e resistência às pragas, processos germinativos da semente pós-colheita, bem como crescimento, desenvolvimento e reprodução (TOMÁS-BARBERÁN e ESPÍN, 2001).

Quanto à sua distribuição na natureza, os compostos fenólicos, podem ser divididos em três classes: pouco distribuídos (como os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona, o resorcinol e os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais); largamente distribuídos (divididos em flavonóides e derivados, ácidos fenólicos como o benzóico e o cinâmico, bem como seus derivados e as cumarinas) e polímeros (como os taninos e as ligninas) (GIADA, 2005; SOARES, 2002).

Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem as classes dos fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, carotenóides, flavonóides (antoxantinas e antocianinas), tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico e esteróis (ROESLER *et al.*, 2008).

Existem diferentes métodos para determinar o índice total dos compostos fenólicos em alimentos e plantas. Os primeiros estudos foram realizados por Folin e Ciocalteau (1927), Swain e Hillis (1959), Singleton e Rossi (1965), Fantozzi e Montedoro (1978).

O método atual mais utilizado é o *Folin-Ciocalteau*, no qual a mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico, em meio básico, se reduzem ao oxidar compostos fenólicos, originando óxidos azuis de wolfrâmio (W_8O_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}) (MIRSAEEDGHAZI *et al.*, 2010; MEZADRI *et al.*, 2008; KUSKOSKI *et al.*, 2006; NACZK e SHAHIDI, 2004; MOYER *et al.*, 2002).

Alguns frutos cítricos como acerola, laranja e limão apresentam concentrações elevadas de ácido ascórbico, enquanto que em morango, amora e açaí, predominam determinados grupos de flavonóides como as antocianinas, flavonóis e flavonas (CORDENUNSI *et al.*, 2005; POZO-INSFRAN, BRENES e TALCOTT, 2004; ASSIS, LIMA e OLIVEIRA, 2001).

Efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos ao ácido ascórbico e aos compostos fenólicos presentes nas frutas, vegetais, cereais, chás e vinhos, principalmente a contribuição para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas. Estudos epidemiológicos e clínicos *in vitro* mostram efeitos biológicos relacionados aos compostos fenólicos da dieta, tais como: atividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (BEER *et al.*, 2005).

A capacidade fisiológica dos compostos fenólicos deve ser mais bem compreendida se considerarmos que, *in vitro*, sua capacidade antioxidante varia não somente em função da estrutura química destas substâncias, mas também do tipo e polaridade do solvente empregado em sua extração, dos procedimentos de isolamento e da pureza dos compostos estudados, do substrato a ser protegido pelo antioxidante, bem como se o ensaio será desenvolvido em sistema aquoso ou lipídico (GIADA, 2005).

Alguns estudos têm sugerido que o fator determinante da atividade antioxidante é a natureza lipofílica das moléculas e a afinidade do antioxidante por lipídeos (MOURE *et al.*, 2001).

Diversos métodos vêm sendo desenvolvidos para determinar o potencial antioxidante em alimentos, tais como: DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), ABTS (ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato), sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio), FRAP (Poder Antioxidante na Redução do Ferro), TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) e o método Rancimat (KUSKOSKI *et al.*, 2005; OZCELIK *et al.*, 2003; ANTOLOVICH *et al.*, 2002; CINTRA e MANCINI-FILHO, 2001).

Alguns métodos determinam a habilidade dos antioxidantes na varredura de radicais livres gerados no meio de reação, outros medem a varredura de espécies radicais estáveis pelos antioxidantes, ou a eficiência dos antioxidantes em remover radicais de oxigênio gerados por sistema enzimático ou, ainda, a inibição da peroxidação lipídica pelos antioxidantes (PULIDO, BRAVO e SAURA-CALIXTO, 2000).

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico foi, primeiramente, desenvolvido por Marco (1968) e, posteriormente, modificado por Miller (1971). Fundamenta-se em medidas espectrofotométricas (450-470 nm) da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; ANTOLOVICH *et al.*, 2002; RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996).

O sistema β - caroteno e ácido linoléico é um dos métodos mais utilizados em estudos da avaliação da capacidade antioxidante de frutos, vegetais e sementes ricas em lipídeos. Amarowicz *et al.* (1996) empregaram este método para determinar a capacidade antioxidante do extrato de semente de mostarda.

Em um estudo para avaliar a capacidade antioxidante de suco de maçã, Loots, Vander Westhuizen e Jerling (2006) empregaram o sistema β -caroteno e ácido linoléico, bem como Jardini e Mancini-Filho (2007) na avaliação da atividade antioxidante de diferentes extratos da polpa e sementes da romã. Na avaliação da capacidade antioxidante de suco de acerola, Mezdri *et al.* (2008) também utilizaram esta metodologia.

O método que utiliza o radical livre 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato (ABTS) tem sido bastante empregado, por ser um método estável e sensível para avaliação de amostras de frutas (OZGEN *et al.*, 2006), podendo ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis, e apresentando vantagens em relação

a outros métodos. Sua utilização em alimentos como o tomate, milho de soja, vinhos e cervejas, além de amostras biológicas descrita por Nenadis *et al.* (2004).

Kuskoski *et al.* (2005) utilizaram o método ABTS para determinar a atividade antioxidante de diferentes polpas de frutos (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá), Mezdri *et al.* (2008) também o empregaram em sucos de acerola.

Segundo Bondet, Brand-Williams e Berset (1997) e, Sanchez-Moreno, Larrauri, Saura-Calixto (1998), o radical estável DPPH, tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade dos antioxidantes naturais presentes em frutas no sequestro de radicais livres, e apresenta como vantagens principais, a estabilidade do radical e sua disponibilidade comercial. Este radical atua como radical oxidável a ser reduzido pelo antioxidante e como indicador para a reação $\text{DPPH} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}$, apresentando um máximo de absorbância a 518 nm (FRANKEL e MEYER, 2000).

O método DPPH consiste em determinar a capacidade de captura do radical livre pelos compostos antioxidantes, ou seja, na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (BLOIS, 1958). Após a adição do antioxidante, ocorre uma redução na absorbância, proporcional à concentração e à atividade antioxidante da amostra (SANCHEZ-MORENO, LARRAURI e SAURA-CALIXTO, 1998), que é comparada aquela de um antioxidante padrão (geralmente, o ácido ascórbico ou vitamina C ou Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E ou α -tocoferol) e usada como indicador da atividade antioxidante (RE *et al.*, 1999).

De acordo com Kuskoski *et al.* (2005) o método ABTS apresenta vantagens em relação ao método DPPH, pois além do tempo necessário para a realização das medidas da absorbância (6 minutos para o ABTS e 30 minutos para o DPPH), o método DPPH apresenta um custo mais elevado.

O método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio), foi desenvolvido por Prior e Cao (1999), utilizando como moléculas-alvo dos radicais livres de oxigênio, as ficobiliproteínas, β -ficoeritrinas ou R-ficoeritrina (PE), altamente fluorescentes, que contêm um pigmento vermelho fotorreceptor (34 grupos prostéticos tetrapirrólicos unidos covalentemente). Essas proteínas derivam de espécies de algas roxas (cianofíceas) e cianobactérias. O fundamento do método consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformação ao sofrer dano oxidativo. Tem sido empregado para medir a capacidade antioxidante de compostos puros, como a melatonina e flavonóides; em fluidos

biológicos, como o soro, a urina e o plasma; em produtos naturais, como frutas e demais vegetais; e em produtos industrializados, como vinhos e chás (PRIOR e CAO, 1999).

O método FRAP foi denominado em ensaio como o poder antioxidante para a redução férrica ou do ferro (PULIDO, BRAVO e SAURA-CALIXTO, 2000), baseando-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzirem, em condições de baixo pH, o complexo Fe^{+3} /tripiridiltriazina (TPTZ) para a forma ferrosa Fe^{+2} , de intensa cor azul e com absorção máxima a 593 nm (OU *et al.*, 2002).

Esse método é econômico, e seu procedimento direto e rápido (6 minutos de reação com a amostra analisada), com resultados que são altamente reprodutíveis (BENZIE e STRAIN, 1999). A principal desvantagem é que a capacidade redutora medida pode não refletir necessariamente a atividade antioxidante. Uma vez que o método não inclui um substrato oxidável, nenhuma informação é fornecida sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes (FRANKEL e MEYER, 2000).

O método TBARS não é amplamente utilizado e baseia-se na reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com os produtos da decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados resultantes da oxidação de um substrato lipídico. Um dos principais produtos formados é o malonaldeído, que reage com duas moléculas de TBA formando um pigmento avermelhado/arroxeadado (TBARS), que pode ser medido em espectrofotômetro a uma absorbância máxima entre 532 e 535 nm (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999). Esse método envolve dois procedimentos distintos: primeiro, o substrato é oxidado com a adição de um íon metálico de transição, como o cobre ou ferro, ou uma fonte de radical livre como, por exemplo, o AAPH (2,2'-azobis 2-amidinopropano dihidroclorídrico) e, em seguida, a extensão da oxidação é determinada pela adição do TBA e sua medida na amostra por espectrofotometria (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

A estabilidade oxidativa de óleos e gorduras comestíveis é fator determinante para a avaliação da qualidade dos mesmos, uma vez que a auto-oxidação é provocada pelo oxigênio atmosférico (LAUBLI e BRUTTEL, 1986). Testes rápidos para avaliar a resistência de óleos e gorduras à oxidação vêm sendo desenvolvidos.

O equipamento Rancimat é um dos utilizados para determinar esta resistência. O método empregado baseia-se no registro das variações da condutividade elétrica da água destilada, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular obtidos após a iniciação forçada da oxidação da amostra à elevada temperatura (RAMALHO e JORGE, 2006; SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

Embora exista uma grande diversidade de métodos, não existem métodos aprovados ou padronizados ou oficiais para a determinação da atividade antioxidante (GIADA, 2005; CINTRA e MANCINI-FILHO, 2001; FRANKEL e MEYER, 2000). Esta diversidade de métodos proporciona resultados numéricos distintos e de difícil comparação (MARTÍNEZ-VALVERDE, PERIAGO e ROS, 2000).

Em estudos com compostos modelos, foram observadas diferenças significativas no potencial antioxidante relativo de compostos fenólicos, podendo um composto apresentar-se fortemente antioxidante em um método e pró-oxidante em outro método. Um fenômeno conhecido como “paradoxo polar” também tem sido bastante relatado, no qual antioxidantes hidrofílicos são mais efetivos do que antioxidantes lipofílicos em volumes elevados de óleo, enquanto antioxidantes lipofílicos apresentam maior atividade em emulsões (MOURE *et al.*, 2001).

1.5. Processos com Membranas de Ultrafiltração e Microfiltração

Os processos mais utilizados na conservação de sucos de frutas são a pasteurização, que elimina os microrganismos patogênicos, e a concentração térmica, na qual há redução da atividade de água do produto. Porém, Jiao, Cassano e Drioli (2004), entre outros autores, observaram que os processos com elevadas temperaturas (DE PAULA *et al.*, 2004) provocam perdas de nutrientes, degradação da cor e alteração no sabor do produto, entre outras alterações (CASSANO, MARCHIO e DRIOLI, 2007).

A pasteurização constitui o método de conservação mais usual no processamento de sucos de frutas (DE PAULA *et al.*, 2004), a fim de prevenir tanto a sua deterioração devido à presença de microrganismos, quanto à inativação de enzimas, naturalmente presentes nestes alimentos (TRIBESS, 2003). Entretanto os compostos do aroma e do sabor das frutas são geralmente degradados quando o tratamento térmico é aplicado (CASSANO *et al.*, 2003).

Em contrapartida, processos e/ou combinações de processos têm sido estudados e desenvolvidos, como por exemplo, os processos de separação por membranas de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF), que são tecnologias que utilizam baixas temperaturas e boas condições de pressão, além de manter a qualidade nutricional e sensorial do produto (CARVALHO, CASTRO e SILVA, 2008; CARVALHO *et al.*, 2006).

A tecnologia de membranas tem sido utilizada como alternativa para reduzir as perdas sensoriais e nutricionais que podem ocorrer nos processos comumente utilizados

para conservação, clarificação e concentração de sucos de frutas (ESPAMER *et al.*, 2006; VAILLANT *et al.*, 2005; CASSANO, JIAO e DRIOLI, 2004). A MF, mais especificamente, vem sendo aplicada na clarificação e redução da carga microbiana de sucos de frutas e bebidas (MATTA, MORETTI e CABRAL, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2003).

Nestes processos, o suco integral é separado em duas frações, ou seja, a polpa fibrosa concentrada (suco retentado) e a fração clarificada isenta de polpa e de microrganismos, o suco permeado/clarificado (VAILLANT *et al.*, 2005).

Sucos clarificados podem ser utilizados na formulação de refrescos e bebidas prontas para consumo, repositores eletrolíticos, refrigerantes carbonatados ou como insumo na indústria de sorvetes, compotas, doces e geléias. Por outro lado, a fração retida pela membrana apresenta características físicas e químicas muito similares às do suco integral, podendo ser utilizada como insumo nas indústrias processadoras de suco e de xaropes a base de frutas (VAILLANT *et al.*, 2005; CASSANO, JIAO e DRIOLI, 2004).

Os processos de UF e MF vêm sendo utilizados pelas indústrias de alimentos, na clarificação de líquidos, concentração, esterilização a frio, produzindo alimentos isentos de aditivos químicos e com baixo consumo energético, podendo oferecer produtos alternativos nutritivos e saborosos (CARVALHO, CASTRO e SILVA, 2008; KOROKNAI *et al.*, 2008; CASSANO, JIAO e DRIOLI, 2004; GIRARD e FUKUMOTO, 2000).

Os mecanismos de filtração dos processos com membranas utilizam a pressão como força motriz, sendo sua capacidade de separação baseada no tamanho das partículas, ou seja, do seu peso molecular (FRANCHI, LEVY e CRISTIANINI, 2004; CARVALHO, GAVA e ABADIO, 2002).

Segundo Milnes, Breslau e Reardon (1986), as vantagens para a utilização de processos com membranas baseiam-se na redução de custos operacionais, espaço físico, tempo de trabalho, redução da viscosidade e minimização de resíduos, com recuperação do suco remanescente do processo (suco retentado), além de aumentar a qualidade do produto pela redução da turbidez e possibilidade de recuperação da enzima, quando utilizada.

Habert, Nobrega e Borges (2006) consideram a MF um processo de separação por membranas, mais próximo à filtração clássica ou tradicional, onde água e solutos com dimensões menores que o tamanho dos poros da membrana permeiam através dela,

enquanto outras moléculas ou partículas de maior tamanho ficam retidas nos poros da membrana.

Na MF pode-se operar com aplicação de diferentes pressões, variando de 1,0 (0,05Bar) a 25 psi (2,0Bar) e com membranas de abertura ou tamanho médio de poro de 0,1 a 10 μm , em que o material retido (concentrado) apresenta peso molecular em torno de 500 kDa e o filtrado (permeado) seriam a água e sólidos dissolvidos. Por outro lado, na UF as pressões variam de 10 a 200 psi (0,5 a 13 Bar), sendo o material retido de maior peso molecular, como por exemplo, as proteínas e os polissacarídeos e, no filtrado encontram-se os açúcares, água e sais dissolvidos (SCHNEIDER e CZECH, 1994).

Gao, Beveridge e Reid (1997) avaliaram a estabilidade física do suco de maçã obtido por UF durante seis meses verificando que a membrana de 10 kDa foi eficiente na remoção de proteínas, reduzindo a formação da turbidez no suco durante o seu armazenamento.

Em um estudo realizado com sucos de laranja, repolho, pepino e rabanete, Zeng, Hu e Wu (1999), observaram que os sucos ultrafiltrados conferiram maior transparência e redução do sabor amargo. O mesmo processo foi aplicado ao suco de kiwi, resultando em produto transparente, sem turbidez e, com os níveis iniciais de vitamina C, acidez e açúcares totais (SHI, LI e SHENG, 2002).

Girad e Fukumoto (2000) descreveram as aplicações da UF e da MF, considerando os efeitos dos fatores como: preparo do produto, seleção da membrana adequada a ser utilizada e os parâmetros operacionais sobre o desempenho da membrana. Observaram esses processos na clarificação de sucos de frutas e suas combinações em processos térmicos e troca iônica, na desacidificação de sucos de maracujá e remoção da adstringência do suco de *grapefruit*.

Mirsaeedghazi *et al.* (2010) compararam os processos de UF e MF na clarificação de suco de romã, utilizando membranas planas de acetato de celulose com tamanhos de poros de 0,22 μm (MF) e 0,025 μm (UF), e observaram que os fluxos médios de permeado e o volume de suco clarificado obtidos na MF foram maiores que na UF. Portanto, o processo de UF, além do seu custo mais elevado e maior tempo de operação, não oferece nenhuma vantagem sobre o processo de MF quando aplicado em sucos de frutas, como no caso do suco de romã.

1.6. Tipos de Membranas Utilizadas em Processos de Microfiltração

A membrana deve ser definida, essencialmente, como uma barreira que separa duas fases e restringe o transporte de uma ou várias substâncias por um processo seletivo, podendo ser homogênea ou heterogênea, simétrica ou assimétrica em estrutura, sólida ou líquida, carrear carga positiva ou negativa e, também, ser neutra ou bipolar. O transporte através da membrana pode ser efetuado para convecção ou para difusão de moléculas individuais, induzindo para a carga elétrica ou concentração, pressão ou temperatura gradiente (MULDER, 1991).

Segundo Moresi e Lo Presti (2004) as membranas são meios filtrantes que apresentam uma barreira seletiva, a qual retém partículas de tamanho e pesos moleculares diferentes de acordo com o diâmetro dos poros. Cada processo de separação com membranas possui uma faixa de tamanho de partículas específicas de separação, em decorrência da morfologia da membrana.

Processos de separação distintos requerem membranas com características bem diferentes. Nos processos de MF e UF, o principal fator responsável pela separação é a diferença de tamanho entre moléculas ou partículas. Membranas para este fim são tradicionalmente porosas e funcionam como peneiras, deixando passar o solvente e os solutos menores, conforme demonstrado na Figura 5 (NUNES, 1994).

O tipo de material formador da membrana devem atender a requisitos de estabilidade em diferentes solventes e a diferentes condições de pH e, quanto às propriedades mecânicas, as membranas devem resistir a diferenças de pressão (NUNES, 1994).

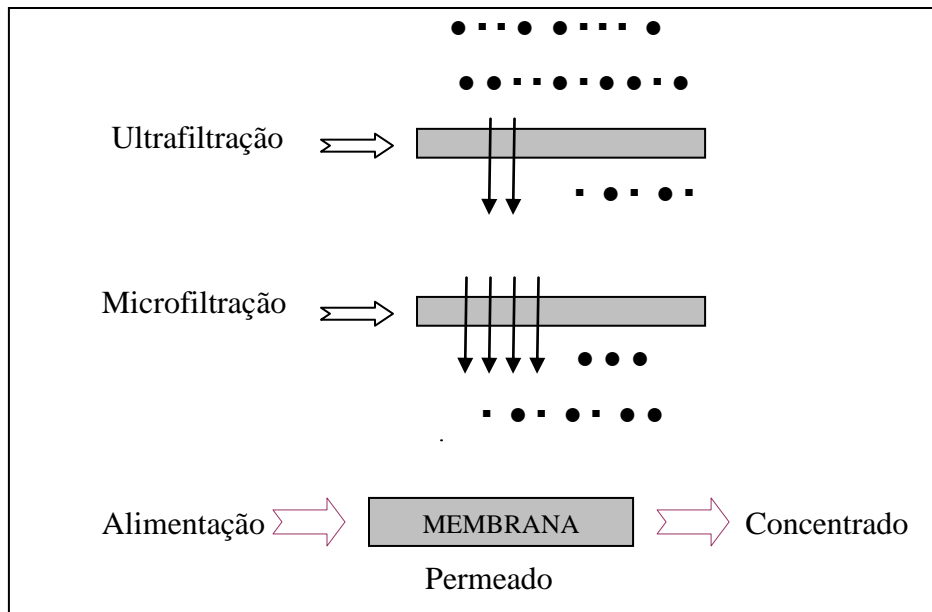


Figura 5 – Esquema da capacidade de separação das membranas de MF e UF

Na MF e UF a principal força motriz para passagem de soluto através da membrana é uma diferença de pressão hidrostática (MULDER, 1991; NUNES, 1994).

Membranas de diâmetro de poro menor que 0,2 mm retêm bactérias e mantêm os nutrientes e componentes aromáticos característicos, preservando sua característica de frescor e aroma natural (VAILLANT *et al.*, 2001), sendo possível com tais processos realizar tratamentos de esterilização a frio (VENTURINI-FILHO, DORNIER e BELLEVILLE, 2003).

Oitenta por cento (80%) dos processos com membranas são realizados para a dessalinização da água do mar. Vinte por cento (20%) se realiza, em sua maioria, na indústria de laticínios e, em grande diversidade de aplicações, nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química e têxtil, entre outras (CHERYAN, 1986).

A UF também possui diferentes aplicações nas indústrias de alimentos, bebidas e laticínios, assim como aplicações na biotecnologia e na área médica (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2003).

As membranas são utilizadas em diversas configurações, como: tipo plana, tubular, fibra oca e em espiral; podendo ser confeccionadas de acetato de celulose, polisulfona (PS), polietersulfona (PES), cerâmica, fluoreto de polivinilideno (PVDF), nylon, metais ou polímeros inorgânicos (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Segundo Beaton (1979) e Cheryan (1986), as membranas de acetato de celulose (AC) apresentam baixo custo, porém são afetadas por temperaturas superiores a 30°C e valores de pH inferiores a 3,0 e superiores a 8,0, além de serem sensíveis à ação microbiana, principalmente bolores, possuindo ainda baixa tolerância ao cloro.

As membranas de polisulfona (PS) possuem alta estabilidade, rigidez e resistência ao calor (75°C) podendo ser utilizadas em temperaturas mais elevadas (125°C). Podem operar em ampla faixa de pH (1 e 13), suportando limpeza cáustica e ácida e operando sob pressões de 2,0 a 8,0 Bar (ANDRADE e PINTO, 1994).

Juarez e Paredes-Lopes (1994) obtiveram suco de jicama (raiz marrom clara macia, comestível, succulenta e doce, introduzida como uma nova cultura no México), clarificado em membranas de PS com abertura de poro de 10 kDa em sistema Pellicon Cassete da Millipore, utilizando pressões de 1,8 a 2,4 Bar, obtendo fluxo médio de permeado de 13 L/m².h, com recirculação do suco no sistema até a obtenção de 2,6 de taxa de volume de concentração.

Membranas de cerâmica para MF e UF de 0,01 a 0,2 µm, foram utilizadas na clarificação de suco de maçã, aumentando a qualidade do suco e a permeabilidade, em cerca de quatro vezes. Os sucos obtidos eram estéreis e o aroma e sabor foram preservados. Quando comparados àqueles obtidos por membranas de PS, apresentaram melhores resultados em termos de teor de açúcares e fosfatos (KONDRASHOV *et al.*, 1996).

De acordo com Nunes (1994), as membranas de cerâmica apresentam um custo elevado, porém possuem vantagens sobre as demais, como a resistência em toda a escala de pH e à altas temperaturas (400 °C), também suportando altas pressões (20 Bar), sem perda da capacidade de permeação.

Ao avaliarem a redução da atividade da polifenoloxidase em suco de banana, Rodrigues *et al.* (2003) utilizaram duas membranas de polietersulfona com pesos moleculares de 10 e 30 kDa, em função do peso molecular médio da enzima ser entre 57 a 62 kDa observando que a UF foi efetiva na clarificação do suco de banana, que as membranas de 30 kDa promoveram fluxo permeado superior ao da membrana de 10 kDa e que a atividade da enzima polifenoloxidase foi reduzida em 97,5%.

Hakimzadeh *et al.* (2006) clarificaram suco de beterraba em membrana de cerâmica (MF) e membrana polimérica (UF). Observaram que a MF apresentou melhores resultados nos parâmetros físicos e químicos do suco clarificado que a UF,

além da redução da turbidez e do teor de sólidos solúveis totais do suco, consequentemente aumentando sua pureza.

Koroknai *et al.* (2008) utilizaram os processos de UF e destilação osmótica a fim de verificar a preservação da capacidade antioxidante de sucos de cereja e groselha das espécies *Aronia melanocarpa*, *Ribes rubrum* L. e *Prunus avium*. Na UF foi utilizada membrana de polietersulfona (45 kDa) e na destilação osmótica membrana tubular de polipropileno de 0,2 µm. Os resultados de ambos os processos foram promissores, refletindo na preservação da qualidade natural e da composição nutricional dos sucos clarificados, preservando ainda os compostos fenólicos e antociânicos responsáveis pela atividade antioxidante elevada.

Pedroso *et al.* (2007) compararam o processo de MF com membranas de cerâmica e polimérica, a 2,0 Bar, na clarificação de suco de acerola. Observaram que o tipo de membrana não interferiu na qualidade nutricional e que outros fatores devem ser considerados, como o custo do equipamento e vida útil da membrana, tendo ocorrido poucas perdas dos nutrientes.

1.7. Clarificação de Sucos

Segundo Venturini Filho, Dornier e Belleville (2003), o permeado obtido na MF é o suco clarificado, sem aparência turva, microbiologicamente estável, sem nenhuma atividade enzimática, quando o diâmetro do poro da membrana é igual ou inferior a 0,3 µm, devendo ter composição química idêntica ao suco original diferindo, apenas, na consistência devido à ausência de polpa.

Os sistemas de clarificação se baseiam na alimentação pressurizada do fluido, paralela à superfície da membrana, promovendo efeito de limpeza constante da superfície interna da membrana, diferenciando-se do sistema convencional de filtração, onde a alimentação é perpendicular à superfície filtrante, provocando mais rapidamente o entupimento dos poros (MALDONADO, 1991; CHERYAN, 1986; MICHAELS, 1981).

As exigências do mercado consumidor, no que diz respeito a sucos de frutas clarificados, levam à investigação de sua qualidade sensorial e propriedades físicas e químicas (CARVALHO, GAVA e ABADIO, 2002), uma vez que nesses processos dois pontos básicos são requeridos pelos consumidores: transparência e homogeneidade (VAILLANT *et al.*, 2001).

Nos processos de clarificação por UF e MF, com ou sem prévio tratamento enzimático (CARVALHO *et al.*, 2003; CARVALHO, GAVA e ABADIO, 2002), vários constituintes de valor nutricional e sensorial podem ser perdidos ou retidos na polpa concentrada (CHAO, WEN e FANG, 1992; ITOUA-GASSAYE, DAVIN e MIETTON-PEUCHOT, 1991).

Suco de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), integral não hidrolisado foi clarificado (CARVALHO, GAVA e ABADIO, 2002) em membranas de MF de polietersulfona com tamanho médio de poro de 0,1 e 0,3 μm , os autores observaram que o suco clarificado em ambas as membranas preservou suas características sensoriais e nutricionais, além de terem obtido sua esterilidade comercial a frio no processo realizado com a membrana de maior tamanho médio de poro (BRESLAU, WEN e FANG, 1984).

De Paula *et al.* (2004) avaliaram a eficiência da clarificação de suco de maracujá pela combinação de MF com membrana tubular de PES de 0,3 μm e pressão transmembrana de 1,5 Bar, associada a tratamento pré-enzimático. A eficiência do processo foi aumentada em função da redução da viscosidade do suco e teor de polpa, não havendo diferenças significativas quanto ao °Brix, pH e acidez das amostras de suco hidrolisado em relação ao suco integral, o resultado foi um produto límpido, isento de polpa e com qualidade e sanidade microbiológica.

Para avaliar o efeito da clarificação da polpa de suco de caju *in natura* e da polpa hidrolisada em processos de MF e UF, Castro, Abreu e Carioca (2007) utilizaram sistema com membranas tubulares de cerâmica e de fluoreto de polivinilideno, operando à pressão 2,0 Bar. Observaram que os fluxos médios de permeado na MF (300 L/m².h) foram superiores àqueles da UF (140 L/m².h). Os teores de vitamina C, açúcares redutores e açúcares totais se mantiveram constantes, promovendo ao suco de caju clarificado características desejáveis e um suco límpido.

Espamer *et al.* (2006) clarificaram suco de limão por processo de MF, com membrana de PES de 0,2 μm , à temperatura de 20°C, entre 0,2 e 1,0 Bar (PTM), concluindo que, durante o processo, o aumento progressivo da pressão não alterou as características nutricionais do suco clarificado e que foi obtido o melhor desempenho quando a pressão de 0,6 Bar foi aplicada.

Suco de acerola integral hidrolisado foi clarificado por Matta, Moretti e Cabral (2004), em membrana tubular de polietersulfona de 0,3 μm , à pressão 1,2 Bar, com

recirculação do suco, obtendo suco clarificado de acerola, pasteurizado a frio e sem alterações significativas de suas propriedades químicas, preservando-se a qualidade nutricional do produto.

Onsekizoglu, Bahceci e Acar (2010) clarificaram suco de maçã por UF (membrana de polietersulfona de 10 kDa) e MF (membrana de polietersulfona de 0,3 μm), verificando que os dois processos foram eficazes na preservação das características naturais do suco, tais como, cor, aroma e propriedades químicas.

Cassano, Marchio e Drioli (2007) concluíram que o processo de UF aplicado a suco de laranja foi bastante eficaz na preservação de suas características originais, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), minimizando ainda o efeito de *fouling* obtendo um fluxo médio de suco clarificado ao final do processo em torno de 15 L/m².h.

De acordo com Oliveira *et al.* (2006) o *fouling* pode ser entendido como o conjunto de fenômenos capaz de provocar uma queda no fluxo do suco clarificado. Em particular, na UF e MF o declínio de fluxo é muito intenso, podendo atingir grande parte do valor do fluxo inicial.

O entupimento dos poros das membranas por moléculas ou partículas em suspensão consiste na ação mecânica de seu bloqueamento, que pode ocorrer tanto na superfície da membrana como no seu interior, dependendo da sua morfologia (BARROS, 2002).

O acúmulo de espécies rejeitadas na superfície da membrana determina uma queda rápida do fluxo de permeado durante o período inicial de filtração seguido por um declínio lento ao longo do fluxo e o material acumulado na superfície da membrana pode sofrer interações físicas e químicas com a membrana, prejudicando o produto final e o próprio sistema (BRUIJN, VENEGAS e BORQUES, 2002; JIRATANANON e CHANACHAI, 1996).

Assim como qualquer tipo de processo industrial de alimentos, os processos de separação com membranas apresentam diversas vantagens e desvantagens (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2003). A grande desvantagem é o surgimento do fenômeno de *fouling*, considerado um fator chave nos processos de UF e MF, pois pode afetar a viabilidade econômica e comercial de um sistema, uma vez que reduz a produtividade e a vida útil da membrana utilizada (NILSSON, 1990). Como vantagens apresentam aumento do rendimento do suco clarificado, possibilidade de operação em uma única etapa, redução do tempo de trabalho, operações utilizando temperatura ambiente (que

não degradam os alimentos), fácil e rápido sistema de limpeza e preservação das características nutricionais e sensoriais dos alimentos (CASTRO, ABREU e CARIOCA, 2007; VAILLANT *et al.*, 2001).

Sucos de diferentes frutas podem ser clarificados e novos produtos poderão ser introduzidos no mercado consumidor como bebidas isotônicas e/ou energéticas, refrigerantes, geleias e gelatinas. Novas tendências na utilização desses sucos atingem o consumo direto, como suco ou refresco pronto para beber, até a elaboração de misturas (“blends”) e “drinks”, passando por toda a gama de bebidas formuladas e enriquecidas, gaseificadas ou não, licores, entre outros (VAILLANT *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a capacidade antioxidante de sucos de lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. *Tahiti*, obtidos por cultivo convencional e orgânico biodinâmico, integrais e clarificados por MF, bem como suas características físicas e químicas.

2.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar os sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica, integrais e clarificados, quanto à:

- Composição centesimal;
- Análises físicas e químicas (pH, °Brix e acidez titulável);
- Qualidade microbiológica;
- Atividade antioxidante;
- Conteúdo de polifenóis totais.

- Analisar o tamanho das partículas dos sucos integrais de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica;

- Otimizar o processo de microfiltração do suco convencional com membrana de 0,3 µm (tamanho médio de poro), em diferentes pressões transmembrana (0,5; 1,0 e 2,0 Bar), estabelecendo a melhor pressão a ser aplicada no suco de lima ácida orgânica biodinâmica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria – Prima

Foram adquiridos 113 kg de lima ácida (*Citrus latifolia* Tanaka), cultivar *Tahiti*, safra 2009, de plantio orgânico biodinâmico (certificada pelo IBD - Instituto Biodinâmico/ IFOAM - International Federation of Organic Agriculture Movements) e 58 kg de lima ácida de cultivo convencional, safra 2009, ambas em estágio ótimo de maturação, fornecidas pela Fazenda Bom Jesus, localizada no município de Santa Rita do Passa Quatro, São Paulo, Brasil.

3.2. Amostragem

Os frutos foram separados em dois grupos, codificados como LB (lima ácida orgânica biodinâmica) e LC (lima ácida convencional), logo após a colheita.

O grupo LB foi separado em quatro lotes, contendo aproximadamente 28 kg de frutos por lote e o grupo LC foi separado em dois lotes, com aproximadamente 30 kg de frutos em cada lote.

3.3. Cálculos de Rendimento

Os cálculos de rendimento dos sucos e da quantidade de cascas da lima ácida convencional e da orgânica biodinâmica foram realizados por regra de três, a partir do peso bruto de cada lote equivalente a 100% de rendimento.

3.4. Obtenção dos Sucos

Os sucos foram selecionados e preparados de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 6.

As amostras liofilizadas foram utilizadas para as análises de atividade antioxidante e conteúdo de polifenóis totais.

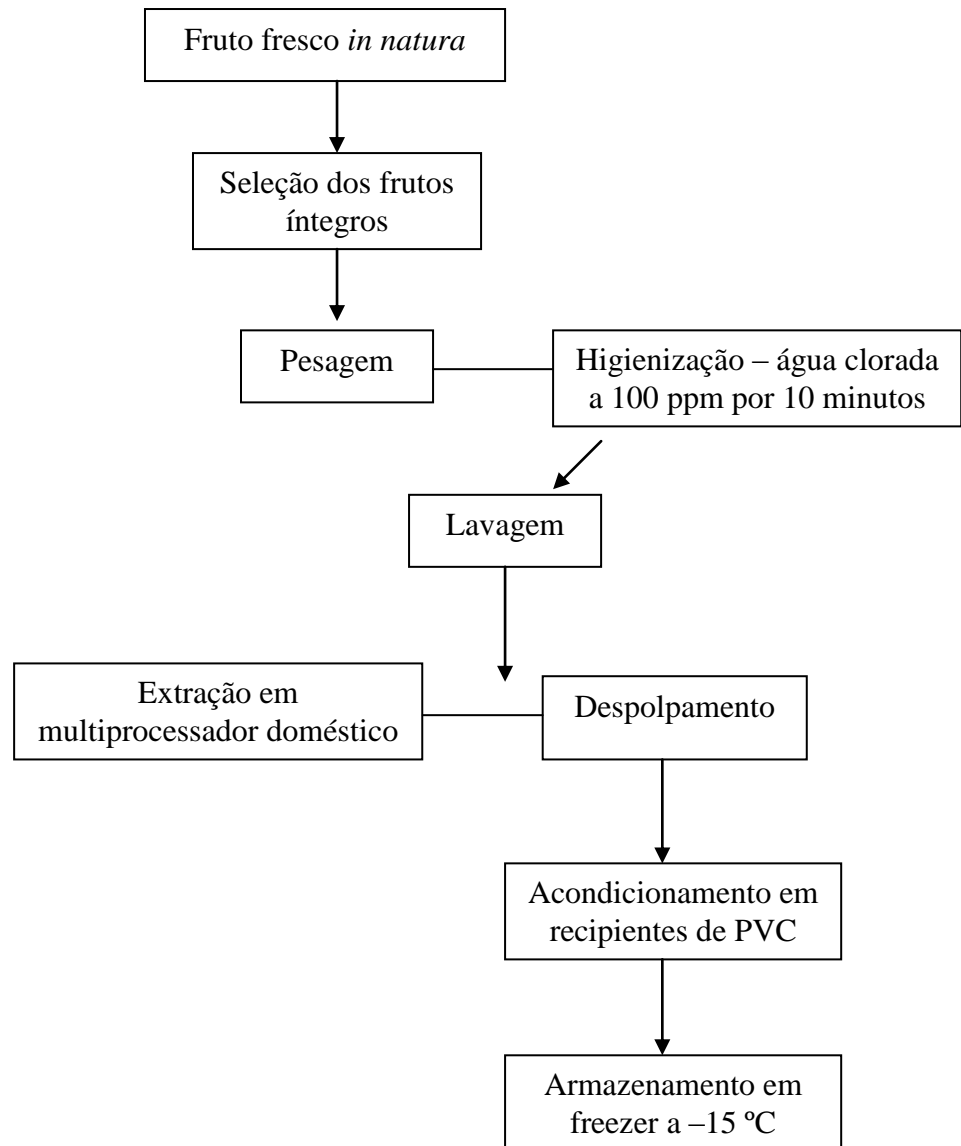


Figura 6 – Fluxograma do procedimento de obtenção dos sucos de lima ácida

3.5. Permeabilidade Hidráulica da Membrana do Sistema de MF

A permeabilidade hidráulica da membrana bem como todos os sucos foram clarificados no sistema de microfiltração – PROTOSEP IV (Koch Membrane Systems Inc., Massachusetts, USA) (Figura 7) com membrana tubular de polietersulfona de 0,3 μm (diâmetro médio de poro).



Figura 7 - Sistema de microfiltração (PROTOSEP IV KOCH)

3.5.1. Procedimento de Limpeza e Recuperação da Membrana

O procedimento de limpeza do sistema foi aplicado antes e depois de cada processo de MF com o suco de lima ácida, visando à recuperação e posterior reutilização da membrana.

A limpeza alcalina foi realizada adicionando-se 80 mL de uma solução de NaOH (1 N / pH 11) a 10 L de água destilada a 40 °C, através da recirculação da solução por 30 minutos no sistema. Após esse tempo, a solução foi descartada, utilizando-se 80 L de água destilada. Na limpeza cloro-alcalina, utilizou-se 40 mL de NaOH (1 N / pH 11) e 130 mL de NaClO (hipoclorito de sódio a 6%) diluídos em 10 L de água destilada a 40 °C, com recirculação no sistema por 30 minutos, seguida de lavagem com 80 L de água destilada. Ao final de cada limpeza, verificou-se o pH.

3.5.2. Medição do Fluxo Hidráulico

Após a limpeza do sistema e antes de cada processo de microfiltração dos sucos no sistema, a permeabilidade hidráulica da membrana foi medida nas pressões previamente estabelecidas para teste (0,5; 1,0 e 2,0 Bar), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Fluxo Hidráulico (L/m}^2\text{.h)} = \frac{\text{vazão (L/h)} \times P}{0,05 \text{ m}^2}$$

Onde:

$0,05 \text{ m}^2$ = área total da membrana

P = pressão aplicada

O valor encontrado foi multiplicado por 0,5, 1,0 ou 2,0, de acordo com a pressão aplicada, obtendo-se o fluxo hidráulico expresso em $\text{L/m}^2\text{.h}$, a fim de observar sua integridade após cada processo de clarificação com os sucos.

3.6. Processo de MF

Na otimização da melhor pressão a ser aplicada no processo, utilizou-se 8,0 L de suco de lima ácida convencional, e a clarificação foi realizada nas pressões de 0,5; 1,0 e 2,0 Bar por 60 minutos, sendo que a cada 20 minutos a pressão foi aumentada para os valores pré-estabelecidos.

Para os cálculos do fluxo, o volume de suco clarificado foi medido a cada 5 minutos. Os melhores fluxos foram obtidos a pressão de 0,5 Bar, tendo sido utilizada para todos os processos, bem como os sucos de lima ácida orgânica biodinâmica.

3.7. Composição Centesimal, Análises Físicas, Químicas, Instrumentais e Microbiológicas

Todas as análises foram realizadas em triplicata, segundo as metodologias preconizadas pela *Association of Official Analytical Chemists - AOAC* (2005) e Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.7.1. Determinação da Composição Centesimal dos Sucos

A composição centesimal dos sucos LC e LB integrais e clarificados foi realizada quanto à:

- **Umidade:** pesou-se aproximadamente 5,0 g de amostra de suco em cápsula contendo uma camada de areia. A amostra foi aquecida em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas. Em seguida, deixou-se esfriar em dessecador até temperatura ambiente e realizou-se a pesagem. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até que a

diferença entre duas pesadas consecutivas fosse menor que 0,05%. O resíduo obtido foi reservado para a análise de extração de lipídeos (AOAC, 2005);

- **Cinzas:** foram determinadas pelo método gravimétrico utilizando-se uma mufla regulada na temperatura de 550 °C (AOAC, 2005);

- **Proteínas:** no balão digestor de kjeldahl pesou-se 1,0 mL da amostra, acrescentou-se mistura catalítica e 10 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), e deixou-se mineralizar até que se obtivesse um líquido claro. Em seguida, esfriou-se a amostra adicionando-se ao balão digestor 5,0 mL de água destilada sob água corrente e transferiu-se o volume mineralizado, quantitativamente, para um balão volumétrico de 100 mL completando-se o volume. A destilação foi realizada com uma alíquota de 10 mL da amostra e HCl a 0,01 N, conforme a técnica estabelecida pela AOAC (2005). O teor de proteína foi obtido multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator de conversão 5,75;

- **Lipídeos:** transferiu-se quantitativamente o resíduo seco da amostra (obtida após a determinação de umidade) para cartuchos de papel, colocando-os em tubo extrator. Pesou-se o balão de Soxhlet, previamente seco em estufa a 105°C e, em seguida, montou-se o sistema de Soxhlet. Colocou-se o solvente (éter etílico) em quantidade igual a duas vezes o volume do tubo de extração e procedeu-se à extração contínua por 6 horas em chapa aquecedora. Após esse tempo de extração, o sistema foi desmontado e realizou-se a evaporação do solvente. O balão com o resíduo permaneceu em estufa a 105 °C por 2 horas para secagem. Após resfriamento em dessecador, realizou-se a pesagem (AOAC, 2005);

- **Carboidratos Totais:** o valor total de carboidratos foi calculado através da diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, lipídeos, umidade e cinzas (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

3.7.2. Análises Físicas, Químicas, Instrumentais e Microbiológicas

- **pH:** utilizou-se potenciômetro marca METROHM 632, após calibração com tampões 4 e 7 (AOAC, 2005).

- **Sólidos solúveis:** o teor de sólidos solúveis totais (°Brix) foi determinado através de leitura em refratômetro de Abbé com leitura direta a 20°C (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

- **Acidez:** foi utilizado dosador automático DOSIMAT-MODELO 655 da METROHM. A titulação foi realizada com 1,0 mL da amostra de suco, utilizando-se NaOH (0,01 N) e fenolftaleína como indicador (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

- **Tamanho de partículas:** foi determinado pelo método ótico de difração e reflexão com raio laser, em analisador de partículas ANALYSETTE 22. Configuração do equipamento na realização das análises: agitação de 49 rpm, velocidade da bomba de 29 rpm, distância da célula de 57 mm a 474 mm, faixa de leitura de 1,04 µm a 1250,45 µm.

- **Análises Microbiológicas:** os sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica, integrais e clarificados, foram analisados quanto à contagem padrão em placas (CPP), bolores e leveduras, coliformes totais e fecais e *Salmonella sp*, e os resultados foram comparados aos parâmetros estabelecidos para sucos de frutas segundo RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Utilizou-se 50 mL de cada amostra de suco LC e LB integrais e clarificados para cada parâmetro analisado em triplicata.

3.8. Determinação da Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante e dos polifenóis totais, os sucos integrais e clarificados foram previamente liofilizados nas seguintes condições: - 40°C, pressão à vácuo < 200 x 10⁻³ mBar, por 18 horas, em liofilizador Labconco (modelo 75223, Kansas City, Missouri, USA).

3.8.1. Método DPPH

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras dos sucos em sequestrar o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) (Figura 8), segundo a metodologia descrita por Menezes e Vicentino (2007), com modificações.

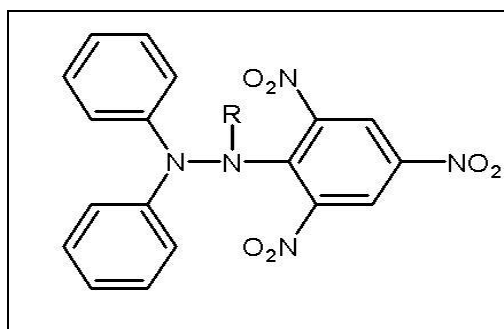


Figura 8 – Estrutura química do radical DPPH.

Preparou-se uma solução de DPPH (0,1 mM) em etanol e, em seguida, as amostras foram preparadas adicionando-se 1,0 mL desta solução de DPPH a 2,5 mL de soluções dos extratos liofilizados dos sucos LC e LB integrais e clarificados diluídos em etanol nas concentrações de 10; 100 e 500 µg/mL.

Nos ensaios brancos, ao invés do DPPH, adicionou-se apenas 1,0 mL de etanol aos extratos diluídos nas mesmas concentrações das amostras, enquanto que o controle negativo foi preparado apenas com 1,0 mL de DPPH adicionado de 2,5 mL de etanol.

A absorbância foi medida a 518 nm em espectrofotômetro (UV mini 1240, UV-vis Spectrophotometers, Shimadzu do Brasil), a cada 1 minuto durante 5 minutos e, em seguida, de 5 em 5 minutos durante um período de monitoramento de 30 minutos.

Paralelamente, construiu-se uma curva da atividade antioxidante do Trolox, utilizado como padrão. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados, foi calculada a diferença de absorbância entre as amostras de suco e do branco. Os percentuais da atividade antioxidante foram obtidos com auxílio da seguinte fórmula:

$$\text{Antioxidante (\%)} = 100 - (\text{Abs}_{\text{AM}} - \text{Abs}_{\text{BR}}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{CN}}$$

Onde: Abs_{AM} = absorbância da amostra;

Abs_{BR} = absorbância do branco;

Abs_{CN} = valor médio de absorbância encontrado para o controle negativo.

A partir dos dados, foram traçados os gráficos das amostras e do padrão Trolox, onde na abscissa encontra-se a concentração das amostras, em µg/mL e, na ordenada, o

percentual de atividade antioxidante por redução do radical DPPH calculado pelas médias das triplicatas.

A cinética da reação foi calculada por regressão linear, obtendo-se o coeficiente de determinação (R^2) e a equação da reta ($y = ax + b$). O valor encontrado para o CE_{50} foi calculado por regressão linear e representa a concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado em 100% (MENSOR E COL., 2001).

3.8.2. Método ABTS

Segundo Kuskoski *et al.* (2005) esse método é um dos mais utilizados para medir a atividade antioxidante, através da captura do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática, conforme demonstrado na Figura 9. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica.

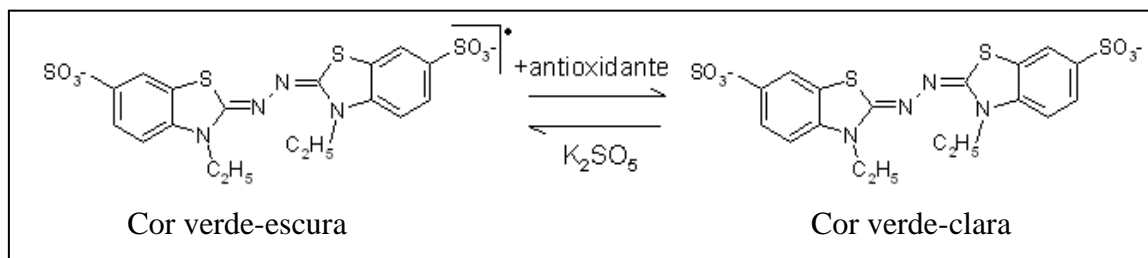


Figura 9 – Estabilização do radical ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

A análise da atividade antioxidante, pelo método ABTS foi realizada conforme a metodologia descrita por Re *et al.* (1999), com modificações.

O radical ABTS foi gerado através da reação de 5,0 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) e 88 μ L de solução de persulfato de potássio a 140 mM (2,45 mM de concentração final). A mistura permaneceu no escuro por 16 h e só depois foi diluída em etanol, para obter absorvância de $0,7 \pm 0,05$ a 734 nm em espectrofotômetro (UV mini 1240, UV-vis Spectrophotometers, Shimadzu do Brasil).

Uma alíquota de 30 μ L da amostra liofilizada dos sucos LC e LB integrais e clarificados (nas concentrações 30; 100 e 300 mg/mL) ou do antioxidante padrão Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) (nas concentrações de 75;

250 e 375 µg/mL), reagiu com 3 mL da solução resultante do radical verde-azulado ABTS, sem a presença da luz.

O decréscimo da absorbância a 734 nm foi medido em diferentes intervalos de tempo (0, 15 s. e, após, a cada 30 segundos) durante um período de monitoramento de 6 minutos, após a mistura reagente/amostra.

A partir das absorbâncias (eixo Y) obtidas das diluições (eixo X) dos sucos liofilizados, em mg/mL, determinou-se a equação da reta.

Para calcular a atividade antioxidante total, substituiu-se na equação da reta a absorbância equivalente a 1.000 µM do padrão trolox. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de trolox, representado pelo cálculo a seguir:

$$Y = ax + b$$

Onde:

y = absorbância correspondente a 1.000 µM de Trolox;

x = diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de Trolox.

A partir do resultado encontrado (x) na equação acima, dividi-se por 1.000 para obter o valor em (g). O resultado final será calculado pela divisão de 1.000 (µM) pelo valor de x (g) e multiplicado por 1 (g) para obtermos o valor final que será expresso em µM Trolox/g de amostra.

3.9. Conteúdo de Polifenóis Totais

A quantificação dos polifenóis totais foi realizada pelo método de *Folin-Ciocalteu* (1927), de acordo com Andrade *et al.* (2007).

Foram preparadas soluções aquosas, a partir dos sucos liofilizados de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica, integrais e clarificados a 0,5 Bar, nas concentrações de 5; 10; 25; 50; 100; 150; 300 e 500 µg/mL. Foram adicionados 1,0 mL da solução do reagente de *Folin Ciocalteu* (2 N) e 2,0 mL de água destilada a 1,0 mL de cada amostra, seguido de homogeneização.

Após 5 minutos, acrescentou-se 1,0 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 10%, às amostras, mantendo-as em banho de ultrassom por 10 minutos. Após 1 hora à

temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 760 nm (UV mini 1240 (UV-vis Spectrophotometers, Shimadzu do Brasil, SP, Brasil).

O ácido gálico foi utilizado como padrão. Para a construção da curva de calibração, soluções de concentrações de 1,0; 5,0; 10; 50; 100 e 125 µg/mL foram preparadas em água destilada e as absorbâncias (760 nm) foram medidas para a construção da curva.

O conteúdo total de polifenóis foi calculado em equivalentes de ácido gálico (EAG) utilizando a equação da reta obtida na curva de calibração.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância ANOVA, na presença de efeito significativo ($p < 0,05$), e o Teste de Duncan para determinar as diferenças entre as médias, com auxílio do programa Microsoft Excel (versão 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento dos sucos integrais de LC e LB

O rendimento dos sucos integrais de lima ácida convencional (LC) e orgânica biodinâmica (LB) foram de 52,60% e 44,65%, respectivamente (Tabela 2), encontrando-se acima do rendimento mínimo de 42% preconizado por Swisher e Swisher (2000). Porém, o rendimento do suco LC foi significativamente maior que aquele do suco LB ($p < 0,05$), o que pode estar relacionado ao percentual mais elevado de cascas nas amostras de LB, devido principalmente, ao aumento do albedo o que influencia na redução dos percentuais de rendimento. Entretanto, rendimentos de 47% foram reportados em suco de limão convencional, cv. Tahiti, resultados estes semelhantes aos encontrados para o suco LB (PEDRÃO *et al.*, 1999).

Tabela 2: Rendimento dos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica.

| Amostras | Rendimento (%) | Cascas (%) |
|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| LC* | 52,60 ($\pm 2,22$) ^a | 40,60 ($\pm 2,15$) ^a |
| LB* | 44,65 ($\pm 3,12$) ^b | 47,13 ($\pm 2,80$) ^b |

* LC – lima ácida convencional

* LB – lima ácida orgânica biodinâmica

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Outros fatores podem afetar o rendimento de suco como, por exemplo, cultivos com altas concentrações de nitrogênio e de potássio, acarretando aumento na espessura da casca (CHITARRA, 1990). A umidade relativa e a temperatura do ambiente também podem influenciar na espessura da casca de frutos cítricos.

O estágio de maturação também influencia no rendimento do suco de lima ácida tendo, sido reportada variação de 55,60% no fruto verde e de 59,40% no fruto maduro (ZIENA, 2000).

5.2. Permeabilidade hidráulica da membrana de MF

Antes de cada medição dos fluxos hidráulicos realizou-se os procedimentos de limpeza alcalina e cloro alcalina, para a recuperação e reutilização da membrana. Os fluxos hidráulicos médios nas diferentes pressões aplicadas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Fluxo hidráulico da membrana nas diferentes pressões aplicadas

| Pressão (Bar) | Fluxo Hidráulico (L/m ² .h) ± DP |
|-------------------------|---|
| 0,5 | 1.241,95 (± 0,06) |
| 1,0 | 2.573,26 (± 0,12) |
| 2,0 | 6.870,07 (± 0,06) |

Observou-se que o maior fluxo hidráulico foi obtido no processo à pressão 2,0 Bar (6.870,07 L/m².h), caracterizando o esperado aumento do fluxo hidráulico de acordo com o aumento da pressão transmembrana aplicada. No entanto, nem sempre a maior pressão aplicada promove fluxos de suco permeado mais elevados do que a pressões mais moderadas.

5.3. Fluxos do processo de MF com o suco de lima ácida convencional

A fim de que se obtivesse a melhor pressão de operação para todos os processos de MF, foram utilizados, inicialmente, na alimentação do sistema, 8,0 L de suco LC obtendo-se 6,0 L (75%) de suco clarificado. Os fluxos médios obtidos nas pressões de 0,5; 1,0 e 2,0 Bar foram 49; 47 e 35 L/m².h, respectivamente (Gráfico 1).

Observou-se pouca diferença entre os fluxos nas pressões aplicadas, nos primeiros vinte minutos de processo, porém após este tempo houve redução expressiva tanto no fluxo do processo operado a 1,0 quanto naquele a 2,0 Bar, demonstrando que houve polarização de concentração, resultado do acúmulo de material sobre a superfície da membrana e/ou *fouling*, proporcionando queda no fluxo de suco clarificado ao longo do tempo (60 minutos) em todos os processos, mais acentuadamente à pressão 2,0 Bar. Em particular, na UF e MF o declínio de fluxo é elevado, mesmo com a permeabilidade hidráulica da membrana completamente recuperada pela lavagem (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

De acordo com Rai, Majundar e Gupta (2005), o declínio do fluxo rápido é atribuído ao crescimento e deposição de uma camada polarizada formada por pectina, celulose, hemicelulose e devido ao alto peso molecular de compostos presentes no suco, fenômeno este observado durante todos os processos realizados no presente estudo.

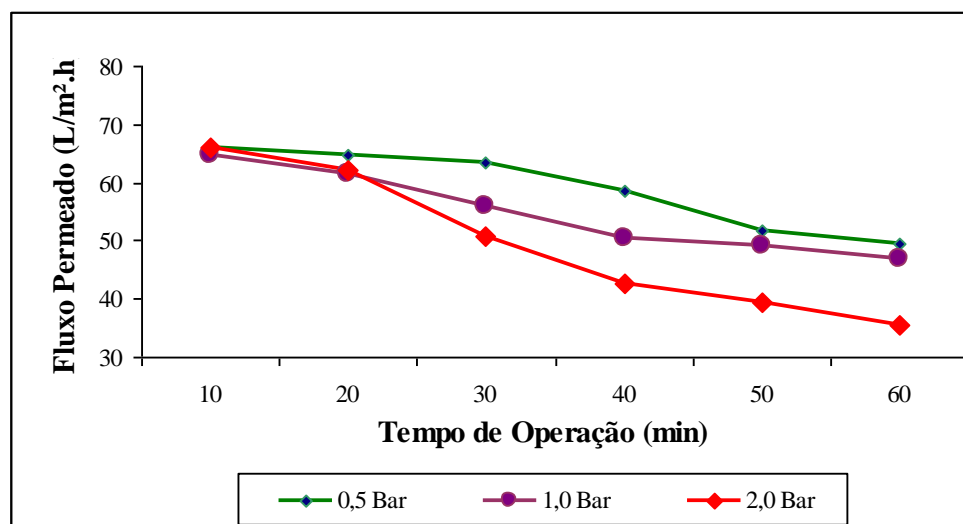


Gráfico 1 - Comportamento do fluxo em função do tempo nas diferentes pressões (0,5; 1,0 e 2,0 Bar) com o suco de lima ácida convencional.

Ao estudar o efeito da clarificação da polpa de suco de caju hidrolisada e *in natura* com os processos de MF e UF, Castro, Abreu e Carioca (2007) utilizaram dois tipos de membranas tubulares, uma de cerâmica com tamanho médio de poro de 0,1 mm e outra de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com retenção de partículas entre 30 – 80 kDa de peso molecular, ambas à pressão transmembrana de 2,0 Bar. Observaram que, pelo fato de a primeira membrana possuir poros maiores que os da segunda, os fluxos médios de permeado obtidos na MF (300 L/m².h) foram superiores aos fluxos da UF (140 L/m².h). A hidrólise enzimática nos processos de UF não acarretou aumento no fluxo de suco permeado e o fluxo no suco clarificado hidrolisado foi menor que no suco clarificado *in natura* (sem tratamento enzimático prévio).

Cassano, Jiao e Drioli (2004) clarificaram suco de kiwi, com membrana tubular de polivinilideno de 15 kDa (UF), aplicando pressões transmembrana de 0,8 a 5,5 Bar, observando que o fluxo de permeado diminuiu, gradualmente, com o tempo de funcionamento, devido à polarização de concentração e à formação de camada gel sobre

a superfície da membrana. O fluxo inicial do permeado foi de 15,65 L/m².h, obtendo-se fluxo final de 7,0 L/m².h.

O mesmo foi encontrado por Cassano, Marchio e Drioli (2007) na clarificação de suco de laranja, onde foi observado fluxo inicial de permeado de 19 L/m².h e de 11 L/m².h ao final do processo, à pressão de 0,5 Bar.

5.4. Fluxos dos processos de MF com o suco de lima ácida orgânica biodinâmica

Nos processos de MF com o suco LB adotou-se a pressão de 0,5 Bar, por 60 minutos, obtendo-se volume médio de 6,0 L de suco clarificado a partir de 8,15 L de alimentação, com 73% de rendimento do processo (Gráfico 2).

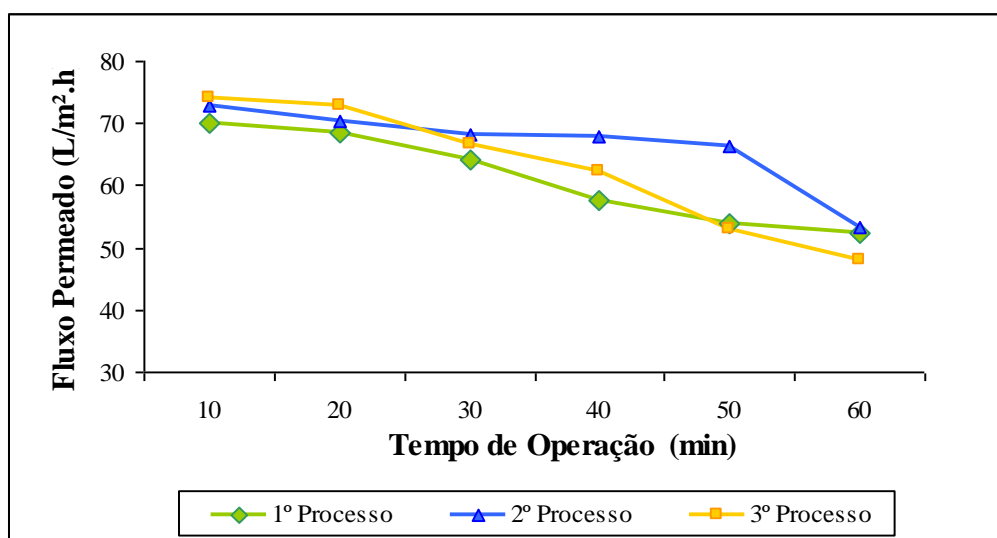


Gráfico 2 - Comportamento do fluxo em função do tempo nos três processos com suco de lima ácida orgânica biodinâmica a 0,5 Bar.

Os sucos clarificados apresentaram coloração verde-claro, aspecto límpido, translúcido e bastante atrativo (Figura 10). Vários autores obtiveram sucos clarificados por processos de MF, tais como sucos de acerola (MATTA, CABRAL e SILVA, 2004), limão (ESPAMER *et al.*, 2006), kiwi (CASSANO, MARCHIO e DRIOLI, 2007), laranja (GALAVARNA *et al.*, 2008) e maçã (ONSEKIZOGLU, BAHCECI e ACAR, 2010), observando as mesmas características.

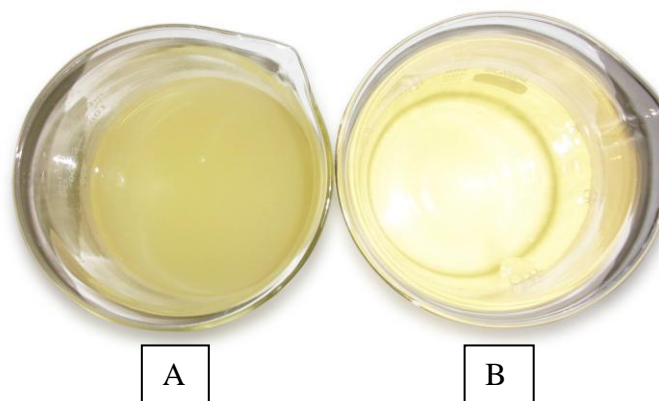


Figura 10 – Sucos de lima ácida orgânica biodinâmica integral (A) e clarificado (B).

Os processos apresentaram fluxos médios de $75 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$, havendo decréscimo progressivo e constante do fluxo até seu final ($50 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$) podendo-se considerá-los elevados.

Verificou-se que no primeiro e terceiro processos, a partir dos primeiros 20 minutos, houve queda no fluxo, mantendo-se declínio progressivo até o final dos processos, provavelmente, devido ao *fouling*.

De Paula *et al.* (2004), utilizando membrana tubular de polietersulfona de $0,3 \mu\text{m}$ (MF) e $1,5 \text{ Bar}$ (PTM) na clarificação de suco de maracujá com polpa, observaram redução mais elevada do fluxo médio de suco clarificado (53%) variando de 30 para $16 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$ ao final de 60 minutos de processo.

Comportamento diverso foi observado nos fluxos de processos de MF com sucos de frutas, diminuindo rapidamente na fase inicial do processo ($10 \text{ min.} \rightarrow 5,0 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$) como, por exemplo, na clarificação de suco de romã em sistema quadro e placas com membranas planas de celulose de $0,22 \mu\text{m}$, mantendo-se constante até o final (MIRSAEEDGHAZI *et al.*, 2010).

Por outro lado, Yasan, Zhijuan e Shunxin (2007) clarificaram suco de maçã pasteurizado, com prévio tratamento enzimático, também em sistema quadro e placas, com membrana de $0,2 \mu\text{m}$ (MF), a $2,0 \text{ Bar}$, obtendo fluxos superiores a $60 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$.

Laorko *et al.* (2010) utilizaram, na clarificação de suco de abacaxi hidrolisado, membranas tubulares de polisulfona de $0,1$ e $0,2 \mu\text{m}$, a $1,0 \text{ Bar}$, obtendo fluxos de $24,2$ e $22 \text{ L/m}^2\cdot\text{h}$., respectivamente.

Contrariamente, Cianci *et al.* (2005) encontraram fluxos médios de 184 L/m².h na clarificação por MF de suco de caju, com e sem tratamento enzimático prévio, utilizando membrana tubular de polietersulfona de 0,3 µm, à 0,6 Bar (PTM).

Carvalho, Castro e Silva (2008) obtiveram fluxo médio de 31,37 L/m².h., na clarificação por MF de suco de abacaxi não hidrolisado, utilizando membrana tubular de polietersulfona de 0,3 µm e pressão transmembrana de 3,0 Bar, enquanto que na UF do mesmo suco, o fluxo médio foi de 17,39 L/m².h, à pressão 6,0 Bar.

Observa-se, porém, que os sistemas utilizados pelos autores acima citados, principalmente aqueles com membranas planas, promovem mais rapidamente a formação de *fouling*.

5.5. Análises Físicas, Químicas, Instrumentais, Microbiológicas e Composição Centesimal dos Sucos Integrais e Clarificados

5.5.1. pH, sólidos solúveis, acidez titulável e composição centesimal

Na Tabela 4 encontram-se os valores de pH, sólidos solúveis, e acidez titulável dos sucos LC e LB integrais e clarificados a 0,5 Bar.

Tabela 4: pH, sólidos solúveis e acidez titulável nos sucos LC e LB integrais e clarificados a 0,5 Bar.

| Amostras | pH | Sólidos Solúveis (°Brix) | Acidez Titulável (g ac. cítrico/ 100 g amostra) |
|----------|----------------------------|----------------------------|---|
| LCI | 2,70 (± 0,01) ^a | 8,50 (± 0,52) ^a | 5,72 (± 0,68) ^a |
| LCC | 2,40 (± 0,04) ^b | 6,40 (± 0,05) ^b | 3,0 (± 0,32) ^b |
| LBI | 2,75 (± 0,03) ^a | 7,20 (± 1,44) ^c | 5,52 (± 0,82) ^a |
| LBC | 2,60 (± 0,01) ^c | 5,60 (± 0,46) ^d | 2,8 (± 0,01) ^b |

LCI – lima ácida convencional integral

LCC – lima ácida convencional clarificada

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica integral

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica clarificada

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p < 0,05).

Os resultados dos sucos de LB integrais (5,52 g ác. cítrico/100 g para acidez, 7,2 °Brix para sólidos solúveis e pH de 2,75) foram semelhantes aos encontrados por Marín *et al.* (2002) em sucos de limão das variedades *Fino* e *Verna* (5,53 g ác.

cítrico/100 g para acidez, 7,5 °Brix para sólidos solúveis e 2,80 de pH) e por Pedrão e col. (1999) em sucos de lima ácida convencional, da cultivar *Tahiti* (5,54 g ác. cítrico/100 g para acidez; 7,7 °Brix e 2,76 de pH).

A acidez titulável dos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica integrais encontra-se dentro dos Padrões de Identidade e Qualidade preconizados pela legislação brasileira, que estabelece valor mínimo de 5,0 g de ácido cítrico/100 g amostra (BRASIL, 2000).

Ziena (2000) observou que o valor de pH no suco de lima ácida, 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 aumentaram ao longo do amadurecimento. Os valores encontrados pelo autor para pH, acidez e °Brix no fruto verde foram 2,62; 6,33 e 9,48, respectivamente.

Na obtenção de suco integral de abacaxi, Sá, Cabral e Matta (2003) encontraram valores de 3,6; 10 e 8,0 para pH, sólidos solúveis totais (°Brix) e acidez em ácido cítrico, valores estes superiores aos encontrados no presente estudo.

Foram observadas perdas na acidez em ácido cítrico e nos sólidos solúveis dos sucos clarificados, tanto em LC (8,50 no integral para 6,40 no clarificado) como em LB (7,20 no integral para 5,60 no clarificado). Embora alguns autores reportem não existirem perdas ou existirem poucas perdas, estudos comprovam que existem perdas desde o momento em que ocorre o fenômeno de polarização de concentração no processo.

Na Tabela 5 pode ser observada a composição centesimal dos sucos LC e LB integrais e clarificados a 0,5 Bar, com os respectivos teores de cinzas, umidade, lipídeos, proteínas e carboidratos totais.

Os resultados da composição centesimal dos sucos integrais de LB foram semelhantes às amostras de LC, diferindo apenas na concentração de carboidratos totais (13,02 g/100 mL) e proteínas (0,72 g/100 mL), valores estes, superiores aos encontrados no suco convencional integral (10,73 e 0,65 g/100 mL, respectivamente).

Os valores observados nestes sucos foram superiores aos recomendados pela USDA (2005), que estabelece os valores médios de proteínas, lipídeos, carboidratos e cinzas, nos sucos de lima ácida (*Citrus latifolia* Tanaka) de: 0,42 (g/100 g), 0,07 (g/100 g), 8,42 (g/100 g) e 0,31 (g/100 g), respectivamente.

Tabela 5: Composição centesimal dos sucos LC e LB integrais e clarificados.

| Amostras | Cinzas (%) | Umidade (%) | Lipídeos (g/100 mL) | Proteínas (g/100 mL) | Carboidratos Totais (g/100 mL) |
|-----------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| LCI | 0,37 ($\pm 0,01$) ^a | 88,03 ($\pm 0,45$) ^a | 0,22 ($\pm 0,01$) ^a | 0,65 (0,01) ^a | 10,73 ^a |
| LCC | 0,08 ($\pm 0,01$) ^b | 91,83 ($\pm 0,28$) ^b | 0,13 ($\pm 0,01$) ^b | 0,24 (0,01) ^b | 7,72 ^b |
| LBI | 0,31 ($\pm 0,04$) ^a | 85,68 ($\pm 0,32$) ^c | 0,27 ($\pm 0,02$) ^a | 0,72 ($\pm 0,02$) ^c | 13,02 ^c |
| LBC | 0,08 ($\pm 0,01$) ^b | 91,33 ($\pm 1,52$) ^b | 0,13 ($\pm 0,01$) ^b | 0,30 ($\pm 0,02$) ^d | 8,46 ^d |

LCI – lima ácida convencional integral

LCC – lima ácida convencional clarificada

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica integral

LBC – lima ácida orgânica biodinâmica clarificada

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Scapiari, Fernandes e Polinto (2008) caracterizaram suco de limão galego e observaram valores semelhantes aos encontrados neste estudo, quanto à umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos (88,26; 0,30; 0,7; 0,2 e 10,54 g/100 g, respectivamente).

Os sucos LC e LB clarificados (91,83 e 91,33%) apresentaram maiores % de umidade que os sucos integrais (88,03 e 85,68%), o que era esperado, tendo em vista as perdas observadas, nos teores de sólidos solúveis pós-clarificação. No entanto, quanto aos teores de cinzas, lipídeos, proteínas e carboidratos os valores foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos dos sucos integrais, conforme apresentado na Tabela 5.

5.5.2. Tamanho de Partículas

O tamanho das partículas encontradas no suco LC integral variou da seguinte forma: partículas com tamanho de 0 a 50 μm ocupando um volume em torno de 3%; de 100 a 300 μm , um volume entre 4 a 10%, e partículas com tamanho maior que 400 μm foram encontradas em volumes pequenos (Gráfico 3).

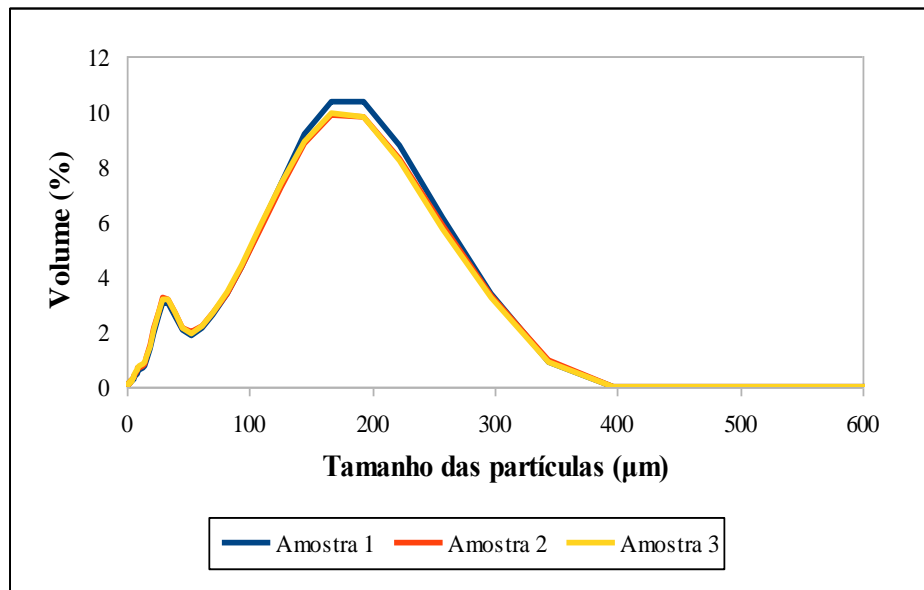


Gráfico 3 - Distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida convencional integral.

Comportamento semelhante foi observado no suco de lima ácida orgânica biodinâmica, integral, porém houve uma concentração de partículas de maior tamanho (200 µm) (Gráfico 4).

Os sucos clarificados apresentaram-se límpidos e sem partículas em suspensão, corroborando resultados encontrados por Carvalho *et al.* (2006) que utilizaram a mesma metodologia para observar a redução da turbidez em suco de limão (*Citrus limon*, L., Burn) integral e hidrolisado. Posteriormente, Oszmianski, Wojdylo e Kolniar (2009) na análise da turbidez de suco de maçã e, Mirsaeedghazi *et al.* (2010) na clarificação por MF de suco de romã, encontraram resultados semelhantes.

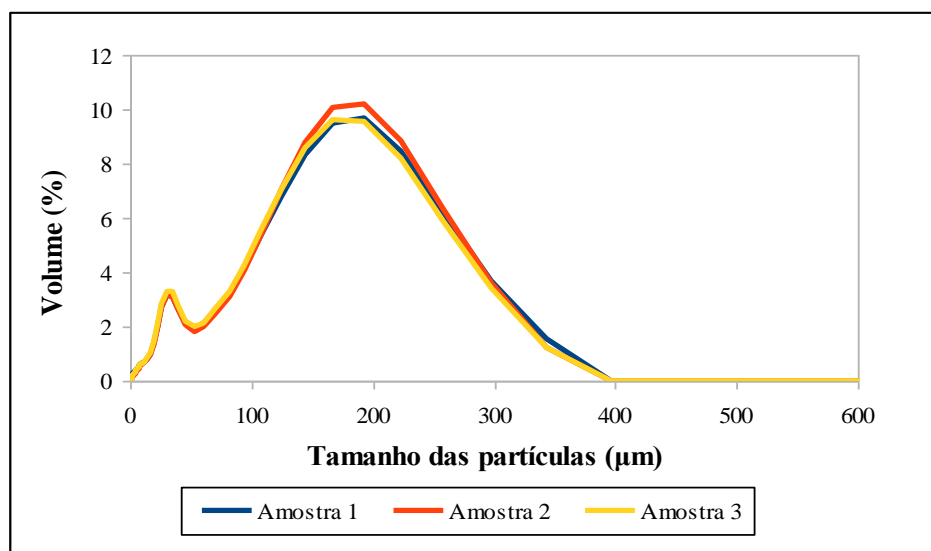


Gráfico 4 - Distribuição do tamanho de partículas do suco de lima ácida orgânica biodinâmica integral.

5.5.3. Análises Microbiológicas

A análise microbiológica dos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica, integrais e clarificados a 0,5 Bar, determinada quanto à contagem padrão em placas (CPP), de bolores e leveduras, coliformes totais e fecais e *Salmonella sp* encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Qualidade microbiológica dos sucos LC e LB integrais e clarificados.

| Amostras | Coliformes Totais (UFC/mL) | Coliformes Fecais (UFC/mL) | Bolores e Leveduras (UFC/mL) | <i>Salmonella sp.</i> (Ausência em 25g ou mL) |
|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--|
| LCI e LBI | Ausência | Ausência | < 10 | Ausência |
| LCC e LBC | Ausência | Ausência | < 10 | Ausência |

LCI – lima ácida convencional integral
LBI – lima ácida orgânica biodinâmica integral
LCC – lima ácida convencional clarificada
LBI – lima ácida orgânica biodinâmica clarificada

Os resultados da análise microbiológica nos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica, integrais e clarificados, encontram-se de acordo com os padrões estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 12 de 02 de janeiro de 2001, que estabelece ausência de coliformes (fecais e termotolerantes) a 35 °C em 50 mL de amostra, ausência de coliformes totais em 50 mL de amostra, contagem de bolores e leveduras inferior a 10 UFC/mL e ausência de *Salmonella sp.* em 25 mL de amostra de suco de fruta, néctares e similares.

Os mesmos resultados foram encontrados por Castro *et al.* (2007) ao analisarem sucos integrais de caju (*Anacardium occidentale* L.), maracujá (*Passiflora spp.*) e goiaba (*Psidium guajava* L.) quanto aos parâmetros microbiológicos, sendo detectada a ausência em coliformes a 35 °C (NMP/50 mL) e *Salmonella sp.* nos sucos analisados.

Pinheiro *et al.* (2006) no estudo de avaliação química, físico-química e microbiológica dos sucos integrais de abacaxi (*Ananas comosus* L.), caju (*Anacardium occidentale* L.) e maracujá (*Passiflora spp.*), verificaram ausência de coliformes totais e fecais em todas as amostras, concluindo que as mesmas atendiam às condições higiênico-sanitárias especificadas pela legislação brasileira vigente.

Diante dos resultados obtidos, pode-se verificar que a MF, nas condições de processo aplicadas, demonstrou ser uma tecnologia eficiente na obtenção da esterilidade comercial dos sucos de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica, já que os sucos integrais dos diferentes cultivos apresentavam-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira vigente.

Resultados semelhantes foram observados por Matta, Cabral e Silva (2004) ao analisarem microbiologicamente sucos de acerola (*Malpighia emarginata* DC.) integrais e clarificados por processo de UF, no período de 90 dias. Concluíram que o suco clarificado de acerola manteve sua esterilidade comercial após os 90 dias de estudo e que o processo de UF preservou a qualidade nutricional e microbiológica dos sucos.

A preservação das características originais dos alimentos, pelo maior tempo possível, após seu processamento, é um dos grandes objetivos da indústria de alimentos. Portanto, as condições do ambiente de armazenamento, como, temperatura, umidade, luminosidade, bem como o tipo de embalagens utilizadas, são aspectos que devem ser avaliados e controlados, visando à manutenção da qualidade nutricional e microbiológica dos alimentos.

5.6. Atividade Antioxidante

5.6.1. Método DPPH

Os percentuais médios da atividade antioxidante (% AAO) dos sucos de LC e LB integrais e clarificados a 0,5 Bar encontram-se na Tabela 7 comparados ao padrão Trolox em função das diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$).

Tabela 7: Atividade antioxidante ($\% \pm \text{DP}$) dos sucos LC e LB integrais e clarificados pelo método DPPH.

| Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | LCI | LCC | LBI | LBC | Trolox |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|
| 2,5 | — | — | — | — | 44,31 \pm 0,11 |
| 5,0 | — | — | — | — | 78,14 \pm 0,40 |
| 10 | 21,06 \pm 0,21 ^a | 8,46 \pm 0,18 ^b | 22,68 \pm 1,02 ^a | 9,07 \pm 0,06 ^b | 87,12 \pm 0,16 |
| 100 | 70,06 \pm 0,13 ^a | 41,82 \pm 0,02 ^b | 68,63 \pm 0,23 ^a | 42,61 \pm 0,18 ^b | — |
| 500 | 98,83 \pm 0,02 ^a | 87,29 \pm 1,06 ^b | 99,12 \pm 0,08 ^a | 88,88 \pm 0,41 ^b | — |

LCI – lima ácida convencional integral

LCC – lima ácida convencional clarificada

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica integral

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica clarificada

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

A análise estatística dos resultados pelo método DPPH demonstrou que, em todas as concentrações analisadas (10; 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$), não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os percentuais de atividade antioxidante de cada amostra dos sucos LC comparados a LB e de LCC comparados a LBC.

Embora a atividade antioxidante no suco LB integral tenha sido inicialmente baixa (22,68% em 10 $\mu\text{g/mL}$), o processo de MF preservou cerca de 90% da atividade no suco clarificado na concentração final, que foi de 500 $\mu\text{g/mL}$, aumento este também observado nos sucos LC integral e clarificado.

Os sucos clarificados (LCC e LBC) apresentaram comportamento semelhante quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH, apresentando atividade antioxidante total em 87,29 e 88,88%, respectivamente.

Na Tabela 8 encontram-se os coeficientes de determinação (R^2) e CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dos sucos LC e LB, integrais e clarificados, e do padrão Trolox, obtidos a partir dos gráficos das amostras analisadas.

Tabela 8: Coeficientes de determinação (R^2) e CE_{50} dos sucos LC e LB integrais e clarificados e do padrão Trolox.

| Amostras | R^2 | CE_{50} * ($\mu\text{g/mL}$) |
|----------|--------|-------------------------------------|
| Trolox | 0,9920 | 2,92 |
| LCI | 0,9750 | 38,22 |
| LBI | 0,9642 | 35,43 |
| LCC | 0,9523 | 135,69 |
| LBC | 0,9406 | 137,89 |

LCI – lima ácida convencional integral

LCC – lima ácida convencional clarificada

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica integral

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica clarificada

* CE_{50} – concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado de 100%.

Em diversos estudos a capacidade antioxidante de sucos e polpas de frutas é realizada com o Trolox como padrão e os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (VILLANO *et al.*, 2007; KUSKOSKI *et al.*, 2006; GIL *et al.*, 2000; PRIOR e CAO, 2000; FOGLIANO *et al.*, 1999), porém neste estudo foram expressos em percentual de atividade antioxidante total dos sucos em comparação ao padrão Trolox.

Observou-se em 500 $\mu\text{g/mL}$ de suco LB integral e clarificado, atividades antioxidantes de 99,12% e 88,88% e CE_{50} de 35,43 e 137,89, respectivamente, o que demonstra pela avaliação do CE_{50} que o suco integral atinge 50% da sua atividade antioxidante em concentração mais baixa que o suco clarificado.

Pela análise de CE_{50} , o Trolox ($CE_{50} = 2,92 \mu\text{g/mL}$) apresentou a melhor e mais elevada atividade antioxidante, revelando que em concentração mais baixa, o Trolox atinge 50% da atividade antioxidante esperada seguido, nesta ordem, pelas atividades

dos sucos LB integral (35,43 $\mu\text{g/mL}$), LC integral (38,22 $\mu\text{g/mL}$), LC clarificado (135,69 $\mu\text{g/mL}$) e LB clarificado (137,89 $\mu\text{g/mL}$).

Kelebek *et al.* (2009) encontraram CE_{50} de 31,08 $\mu\text{g/mL}$, para suco de laranja e Laorko e col (2010) obtiveram CE_{50} de 33,24 $\mu\text{g/mL}$ em suco de abacaxi. Estes valores são semelhantes aos encontrados neste estudo nos sucos LC e LB integrais.

O valor de CE_{50} tem sido utilizado por diversos autores ao avaliarem a atividade antioxidante de diferentes sucos de frutos pelo método DPPH (KELEBEK *et al.*, 2009; JAYAPRAKASHA e BHIMANAGOUDA, 2007; MERKEN e BEECHER, 2000), sendo que o menor valor encontrado para CE_{50} representa maior atividade antioxidante das amostras (VILLANO *et al.*, 2007; ARENA, FALLICO e MACCARONE, 2001).

O padrão Trolox foi analisado em concentrações diferentes e inferiores (2,5; 5,0 e 10 $\mu\text{g/mL}$) às amostras dos sucos LC e LB integrais e clarificados, devido a sua alta atividade antioxidante, como pode ser observado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (87,12%).

As curvas cinéticas da atividade antioxidante dos sucos de LC e LB integrais e clarificados em relação ao padrão Trolox podem ser observadas nos Gráficos 5, 6, 7 e 8.

No gráfico 5, observa-se que os sucos LCI nas concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, foram os que apresentaram a melhor curva cinética quanto ao decaimento da absorbância medida em 518 nm, durante todo o tempo de análise (30 minutos). Este comportamento caracterizou a melhor atividade antioxidante do suco LCI nessas concentrações.

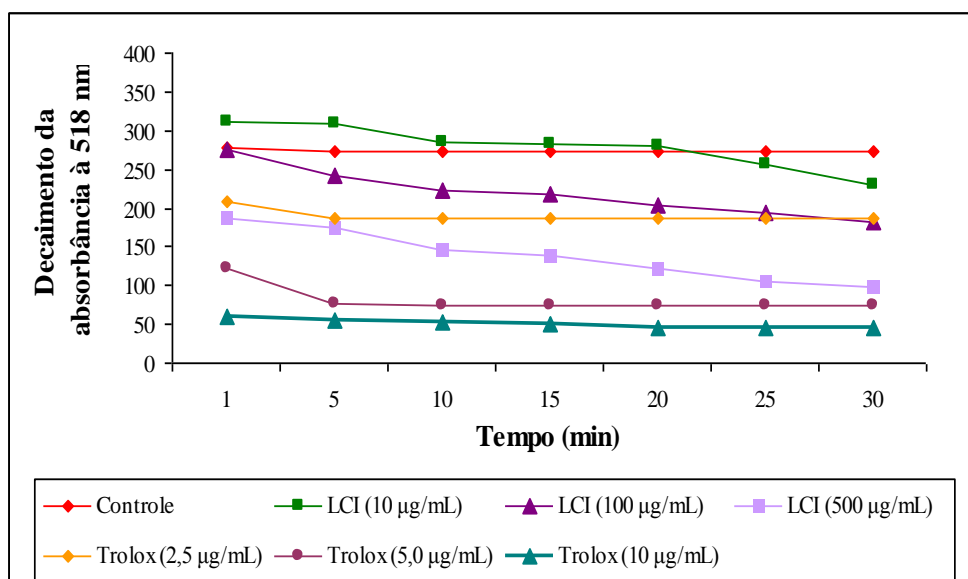


Gráfico 5 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida convencional integral em relação ao padrão Trolox pelo método DPPH.

As amostras dos sucos LC clarificados não apresentaram um decaimento pronunciado das curvas, porém o suco LCC na concentração de 100 µg/mL, foi o que melhor demonstrou a sua atividade antioxidante durante os 30 minutos de reação com o radical DPPH (Gráfico 6).

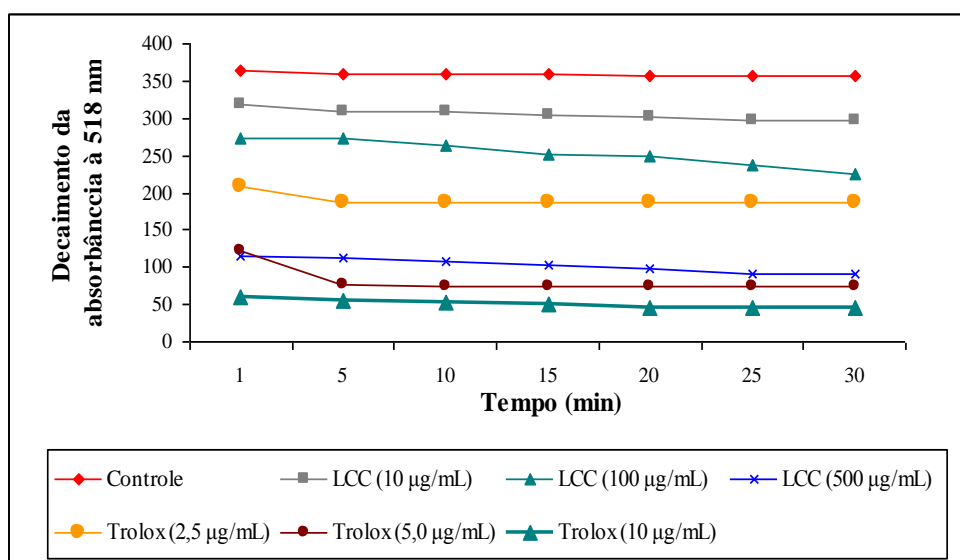


Gráfico 6 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida convencional clarificado em relação ao padrão Trolox pelo método DPPH.

Pelas curvas da cinética, observou-se um comportamento similar das amostras dos sucos LC e LB clarificados, não havendo decaimento das curvas quanto ao potencial antioxidante (Gráficos 6 e 8).

No gráfico 7, pode se observar uma queda pronunciada nos primeiros 5 minutos de reação do suco LB integral (500 µg/mL) com o radical DPPH e essa queda permanece até o final de reação (30 minutos), o que está relacionado ao melhor percentual de atividade antioxidante encontrado (99,12%) nas amostras analisadas.

O estudo da cinética pôde demonstrar o comportamento da atividade antioxidante dos sucos LC e LB integrais e clarificados durante todo o tempo de reação (30 minutos) com o radical DPPH.

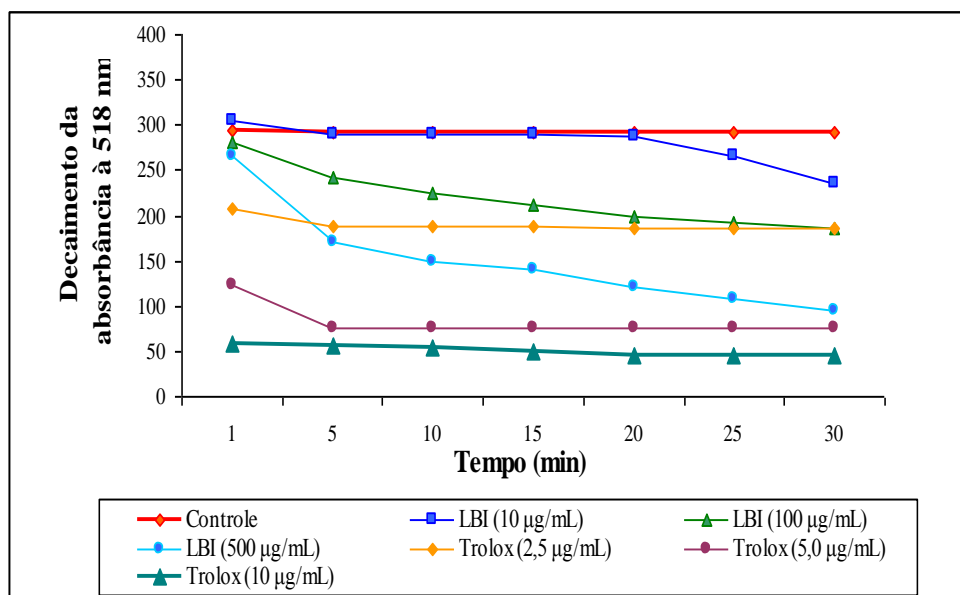


Gráfico 7 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco LB integral e do padrão Trolox pelo método DPPH.

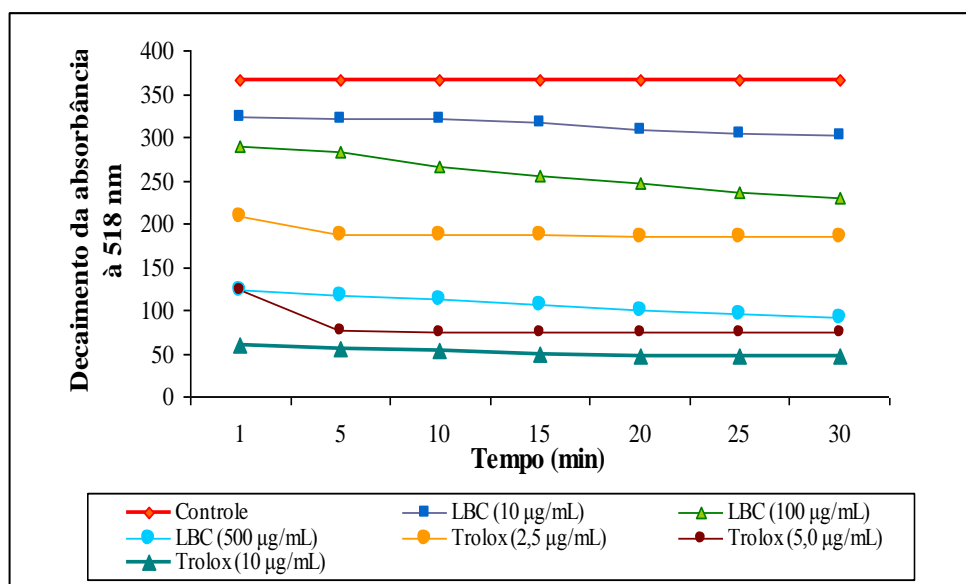


Gráfico 8 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco LB clarificado e do padrão Trolox pelo método DPPH.

Resultados similares aos encontrados com os sucos integrais de LC e LB neste estudo foram encontrados por outros autores ao avaliarem a atividade antioxidante de sucos de frutos integrais pelo método DPPH. Simirgiotis *et al.* (2009) analisaram sucos de morango e observaram 90,40% de atividade antioxidante. Em sucos de goiaba, Thaipong *et al.* (2006) encontraram 98,37% de AAO, enquanto que em suco de maçã, Oszmianski, Wojdylo e Kolniar (2009) observaram 91,06% de AAO.

Guihua Xu e col. (2008) avaliaram a atividade antioxidante de frutos cítricos integrais. A tangerina apresentou 70,33% e o limão 75,50% de AAO pelo método DPPH, resultados estes similares aos reportados previamente para frutos cítricos (CARO *et al.*, 2004; YOO *et al.*, 2004; ARENA, FALLICO e MACCARONE, 2001; GARDNER *et al.*, 2000). Os teores de polifenóis totais e ácido ascórbico revelaram contribuir para o aumento desta atividade antioxidante (GUIHUA XU *et al.*, 2008).

Laorko *et al.* (2010) encontraram 83,60% de AAO em suco de abacaxi clarificado por MF e, Mirsaeedghazi e col. (2010) observaram 74,52 % de atividade antioxidante na clarificação de suco de romã. Nos dois casos, os valores encontrados foram inferiores aos encontrados neste estudo com os sucos LC e LB clarificados (87,29 e 88,88% de AAO, respectivamente).

5.6.2. Método ABTS

A atividade antioxidante total (AAT) dos sucos LC e LB integrais e clarificados determinada pelo método ABTS, encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9: Atividade antioxidante total (AAT) dos sucos LC e LB integrais e clarificados pelo método ABTS.

| Amostras | AAT (μM Trolox/g amostra) |
|----------|--|
| LBI | 85,46 ^a |
| LCI | 78,55 ^b |
| LCC | 14,41 ^c |
| LBC | 11,10 ^d |

LCI – lima ácida convencional integral LCC – lima ácida convencional clarificada
LBI – lima ácida orgânica biodinâmica integral LBI – lima ácida orgânica biodinâmica clarificada

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

Verificou-se que os resultados da AAT dos sucos LC e LB clarificados foram significativamente menores ($p < 0,05$) que os obtidos com os sucos LC e LB integrais.

O suco LBI (85,46 μM Trolox/g amostra) apresentou maior atividade antioxidante que o suco LCI (78,55 μM Trolox/g amostra).

Cassano, Jiao e Drioli (2004) também observaram redução na atividade antioxidante ao clarificarem por UF suco de kiwi. O suco integral apresentou AAT de 69,6 μM Trolox/g amostra, enquanto que o suco clarificado apresentou 15,3 μM Trolox/g amostra, indicando 78% de redução após o processo de UF.

Alguns autores reportaram a atividade antioxidante em equivalentes de Trolox na avaliação de diferentes sucos de frutas pelo método ABTS, tais como em sucos de morango (26,54 μM Trolox/g amostra), amora (38,32 μM Trolox/g amostra) (SELLAPAN, AKOH e KREWER, 2002), laranja (58,81 μM Trolox/g amostra) e abacaxi (47,42 μM Trolox/g amostra) (PROTEGGENTE *et al.*, 2003). Estes valores foram inferiores aos encontrados neste estudo para os sucos LC e LB integrais.

Mezadri *et al.* (2008) encontraram valores superiores aos obtidos nos sucos integrais de LC e LB ao analisarem sucos de acerola (90,28 μM Trolox/g amostra), o

que era esperado tendo em vista que a acerola possui elevados teores de vitamina C quando comparada a outros frutos (1300 mg vitamina C/ 100 g amostra).

Nos Gráficos 9 e 10 observa-se, respectivamente, a atividade antioxidante dos sucos LC e LB integrais e clarificados nas diferentes concentrações (30; 100 e 300 mg/mL) no período de monitoramento de 6 minutos.

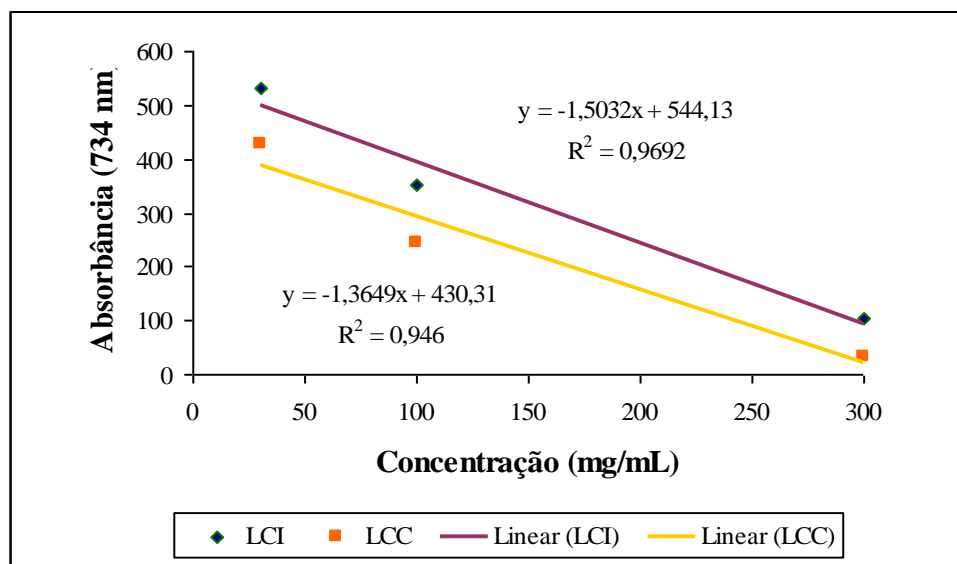


Gráfico 9 - Atividade antioxidante total dos sucos LC integral e clarificado pelo método ABTS.

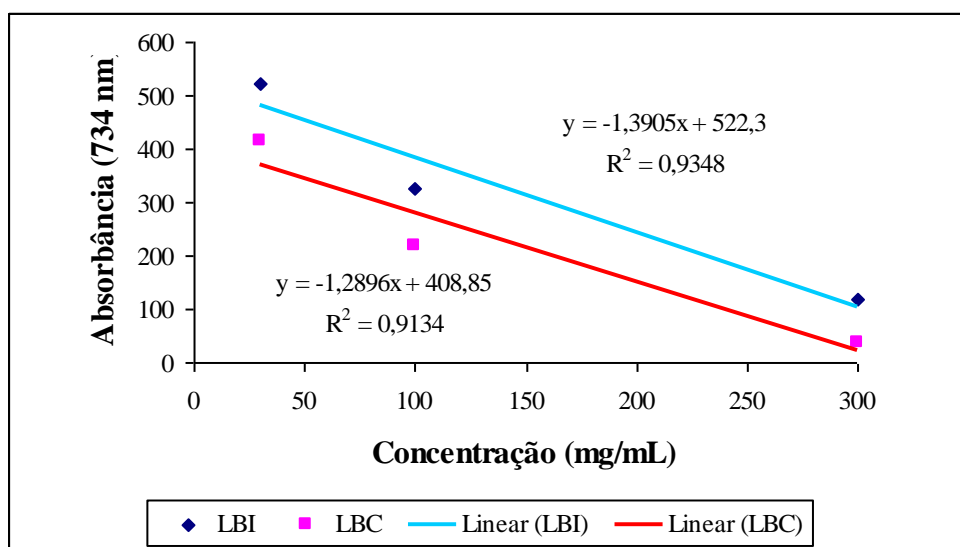


Gráfico 10 - Atividade antioxidante total dos sucos LB integral e clarificado pelo método ABTS.

A avaliação da eficiência do antioxidante relacionada ao seu possível mecanismo de ação foi demonstrada pelas curvas da cinética de decaimento da atividade antioxidante dos sucos quanto ao padrão Trolox pelo método ABTS (Gráficos 11; 12; 13 e 14).

Similramente às análises pelo método do DPPH, o estudo da cinética também demonstrou o perfil da atividade antioxidante dos sucos LC e LB integrais e clarificados durante todo o tempo de reação (6 minutos) com o radical ABTS.

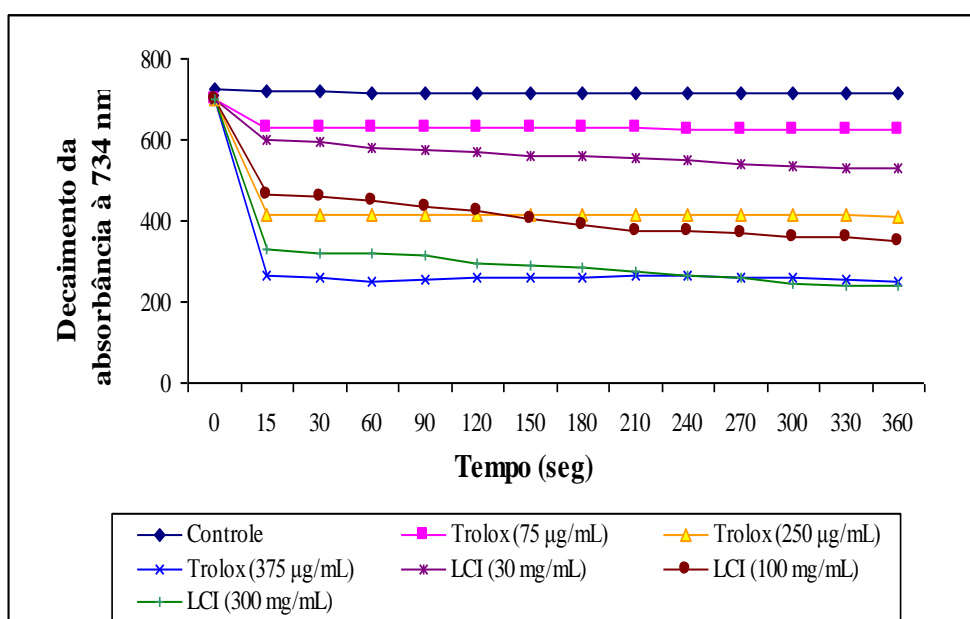


Gráfico 11 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida convencional integral em relação ao padrão Trolox no ensaio ABTS.

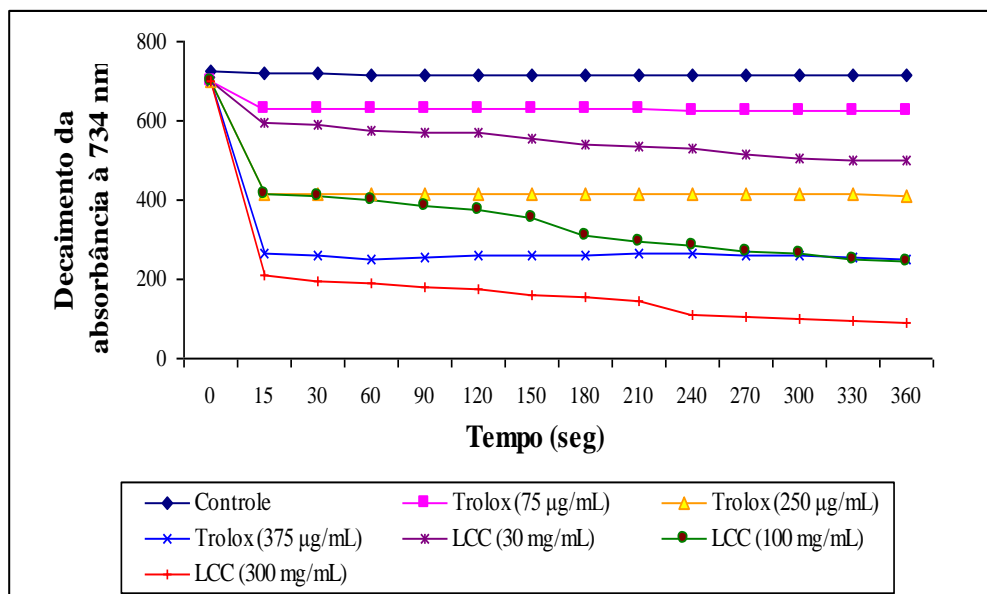


Gráfico 12 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida convencional clarificada em relação ao padrão Trolox no ensaio ABTS.

Nos gráficos 11 e 12 observou-se um decaimento rápido dos sucos LCI e LCC nos primeiros 15 segundos, porém na concentração de 300 mg/mL os dois sucos apresentaram melhor comportamento, sendo observado que atingiram a menor faixa de absorbância ao final do tempo de reação.

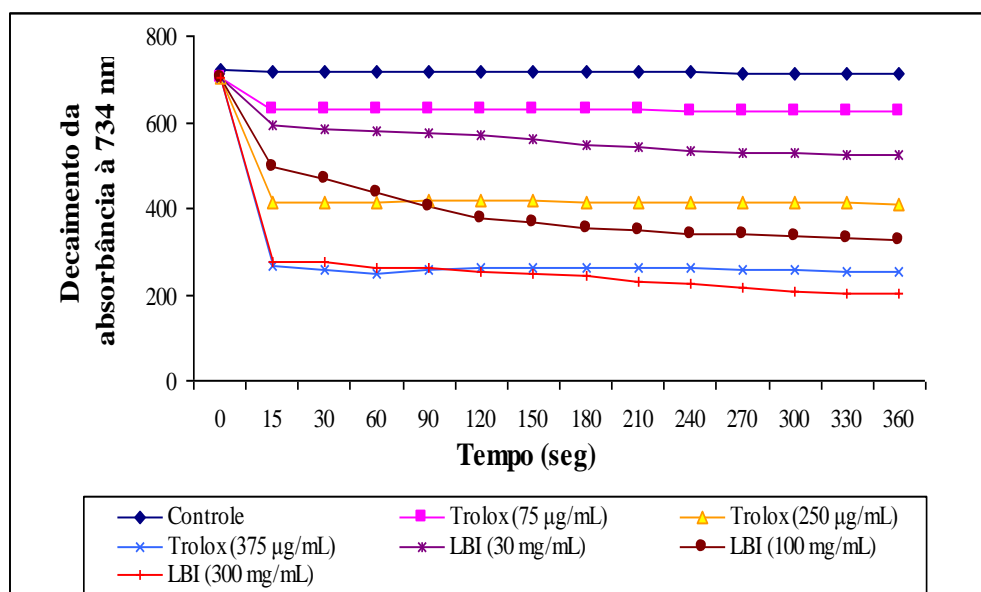


Gráfico 13 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida orgânica biodinâmica integral em relação ao padrão Trolox no ensaio ABTS.

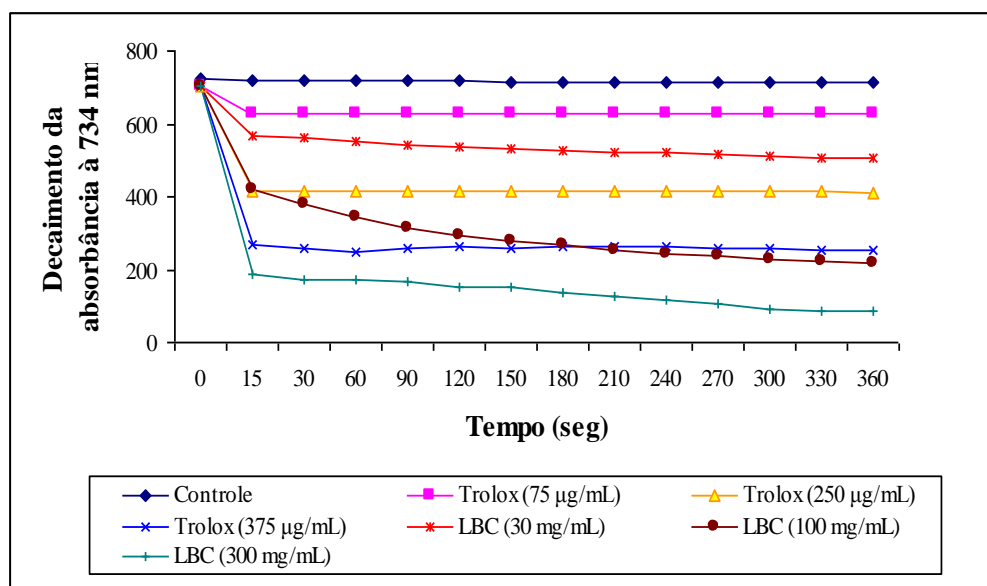


Gráfico 14 - Curva cinética da atividade antioxidante do suco de lima ácida orgânica biodinâmica clarificado em relação ao padrão Trolox no ensaio ABTS.

No gráfico 13 observa-se que o suco LBI na concentração de 100 mg/mL apresentou melhor atividade antioxidante que o Trolox na concentração de 250 µg/mL, enquanto que o LBI (300 mg/mL) apresentou comportamento semelhante ao Trolox, na concentração de 375 µg/mL, durante todo o tempo de reação (360 segundos).

Os sucos LBC a 100 e 300 mg/mL apresentaram melhor atividade antioxidante que o Trolox na concentração de 375 µg/mL como pode-se observar no gráfico 14.

Os resultados do método ABTS confirmaram os resultados encontrados pelo método DPPH, no qual os sucos integrais (LC e LB) apresentaram maior atividade antioxidante que os sucos clarificados.

5.7. Conteúdo de Polifenóis Totais

O conteúdo de polifenóis totais foi expresso como EAG (mg ácido gálico/g amostra) nos sucos LC e LB integrais e clarificados apresentados na Tabela 10.

No Gráfico 15 observa-se a curva de calibração do padrão ácido gálico, cuja equação da reta ($y = 0,0213x - 0,0928$) foi utilizada para o cálculo dos polifenóis totais como equivalentes de ácido gálico (EAG) (mg AG/g de amostra) nas quatro diferentes amostras. O coeficiente de determinação (R^2) entre X e Y no valor de 0,9967 comprovou a correlação positiva.

Tabela 10: Conteúdo de polifenóis totais (EAG) nos sucos LC e LB integrais e clarificados.

| Amostras | Polifenóis Totais (mg ácido gálico/g amostra ± DP) |
|----------|---|
| LBI | 3,36 ± 0,02 ^a |
| LCI | 3,04 ± 0,01 ^b |
| LBC | 2,63 ± 0,01 ^c |
| LCC | 2,42 ± 0,04 ^d |

LCI – lima ácida convencional integral

LCC – lima ácida convencional clarificada

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica integral

LBI – lima ácida orgânica biodinâmica clarificada

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

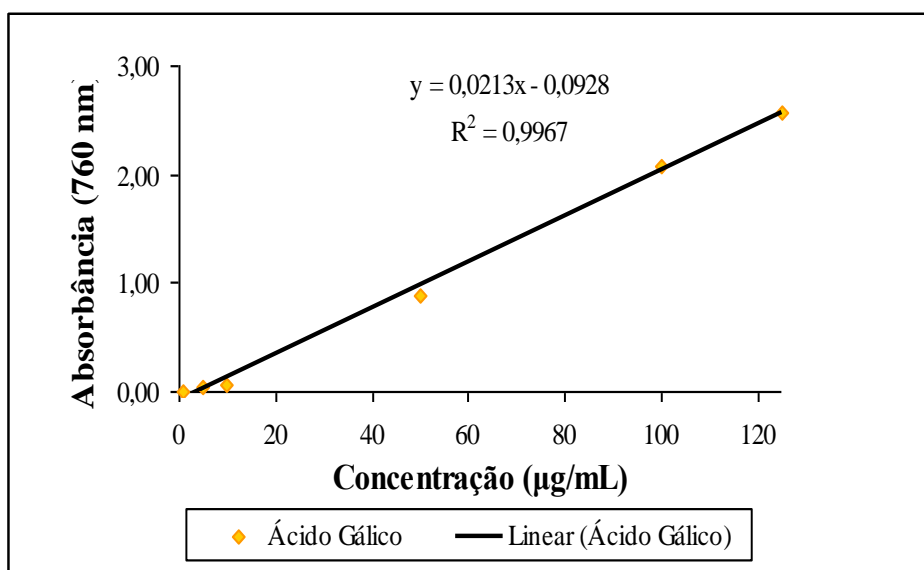


Gráfico 15 - Curva padrão de ácido gálico.

Nos Gráficos 16 e 17 encontram-se os valores de polifenóis totais nos sucos LC e LB integrais e clarificados nas concentrações de 5 a 500 µg/mL.

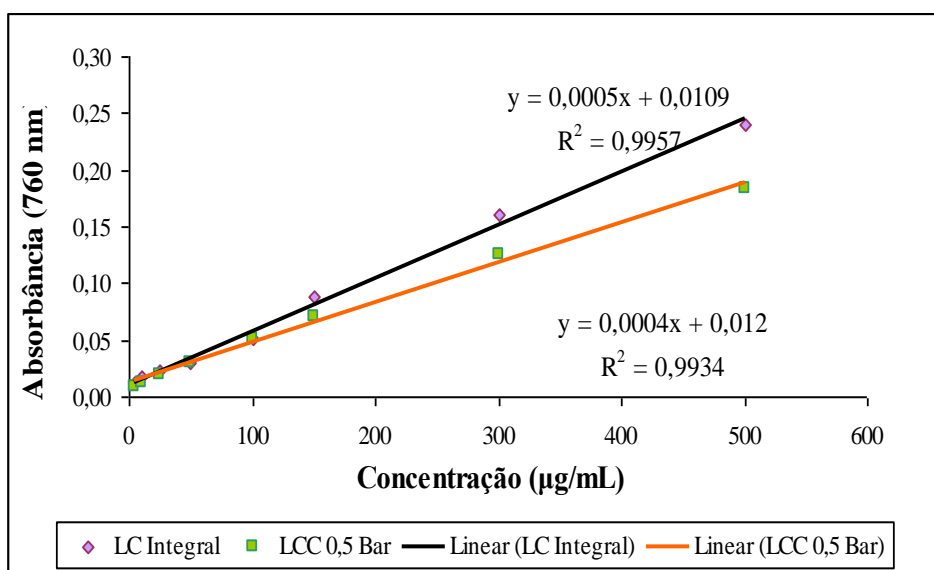


Gráfico 16 - Polifenóis totais nos sucos LC integrais e clarificados.

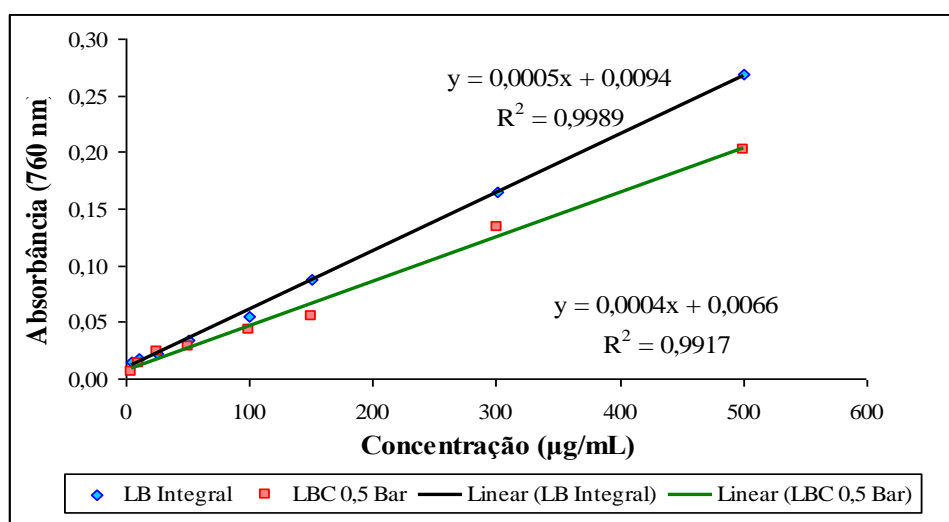


Gráfico 17 - Polifenóis totais nos sucos LB integrais e clarificados.

Verificou-se em 100 g de suco LB integral um teor de polifenóis totais de 336 mg de ácido gálico (AG) e, no suco clarificado 263 mg AG, o que sugere que o processo de microfiltração proporcionou 78 % de recuperação dos compostos fenólicos presentes no suco de lima ácida orgânica biodinâmica.

O suco LC integral (304 mg AG/100 g amostra) também apresentou maior teor de polifenóis que o suco LC clarificado (242 mg AG/100 g amostra), verificando-se que apesar da diminuição dos compostos fenólicos após o processo de MF, houve uma recuperação desses compostos em torno de 79,6%.

A partir dos resultados encontrados, observa-se que os sucos integrais de LC e LB apresentaram valores de polifenóis totais superiores aos encontrados em outros frutos, como o açaí (136,80 mg AG/100 g) (KUSKOSKI *et al.*, 2005), laranja (217 mg AG/100 g) (MONDELLO *et al.*, 2000) e, caqui (145 mg AG/100 g), abacaxi (134 mg AG/100 g) e manga (164 mg AG/100 g) (GORINSTEIN *et al.*, 1999).

Kuskoski *et al.* (2006) encontraram teores de 897,60; 229,60; 580,10; 544,90; 136,80 e 132,10 mg AG/100 g, respectivamente, nos extratos de baguaçu e jambolão, polpa de acerola, manga, açaí e morango. O jambolão, açaí e morango apresentaram teores de polifenóis inferiores aos sucos integrais e clarificados deste estudo.

Cavalcante *et al.* (2006) encontraram 119 mg AG/100 g suco de caju, porém teores bem mais elevados foram reportados por Vargas, Hoelzel e Rosa (2008) em uvas tintas (508,4 mg AG/100 g) e uvas brancas (487,3 mg AG/100 g), reconhecidamente ricas em antocianinas, bem como Rapisarda *et al.* (2008) em sucos de laranja (507,01 mg AG/100 g).

6. CONCLUSÕES

- Os parâmetros físicos e químicos e de identidade e qualidade do suco integral de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica encontraram-se de acordo com aqueles estabelecidos pela legislação brasileira vigente;
- A MF promoveu sucos clarificados com qualidade microbiológica compatível com a legislação brasileira vigente;
- Pelo método DPPH, o processo de clarificação, na condição otimizada, preservou 90% da atividade antioxidante, além de 79,60% e 78% de recuperação dos polifenóis totais nos sucos clarificados de lima ácida, convencional e orgânica biodinâmica, respectivamente.
- As curvas cinéticas obtidas pelo método ABTS mostraram maior estabilidade ao longo do tempo observado (6 minutos) do que aquelas obtidas pelo método do DPPH.
- O tamanho das partículas dos sucos integrais de lima ácida foi similar, demonstrando o mesmo comportamento;
- A otimização da pressão aplicada ao processo de MF demonstrou que fluxos mais elevados foram obtidos em 0,5 Bar, sendo esta condição mais eficiente, proporcionando produtos clarificados, com coloração verde-claro e elevada translucidez;
- Os rendimentos médios dos processos de MF foram de 75 e 73% nos sucos clarificados de lima ácida convencional e orgânica biodinâmica, respectivamente;
- Embora a atividade antioxidante e os polifenóis totais tenham sido preservados, em percentuais elevados, nos sucos clarificados de ambos os cultivos, e tendo em vista à lima ácida não ser fonte rica em polifenóis comparada a outras matérias-primas, o presente estudo revelou resultados promissores quanto ao processo de MF, sendo reprodutíveis e eficientes para futura aplicação em matérias-primas mais ricas nestes compostos com elevada atividade antioxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDILLE, M.H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, p. 891-896, 2005.

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

ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don., Leguminosae-mimosoidae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 2, p. 231-235, 2007.

ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O. Higienização de membrana de ultrafiltração na indústria de laticínios. **Higiene Alimentar**, v. 8, n. 34, p. 9-13, 1994.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analytic**, v. 127, p. 183-198, 2002.

A.O.A.C. - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18^a ed. Washington, D.C.: A.O.A.C International, 2005.

ARENA, E.; FALLICO, B.; MACCARONE, E. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. **Food Chemistry**, v. 74, p. 423-427, 2001.

ASSIS, S.A.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, O.M.M.F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**, v. 74, p. 133-137, 2001.

BARROS, C.B. **Óleos essenciais cítricos do Brasil**. 2 ed. Revisão Atualizada, Fundação Cargill, Campinas, 45p. 1986.

BARROS, S.T.D. **Clarificação dos sucos de acerola e abacaxi por ultrafiltração: Modelagem e Simulação do Fluxo de Permeado e Determinação dos Mecanismos de Fouling**, 2002, 112 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

BARROS, S.T.D.; ANDRADE, C.M.G.; MENDES, E.S.; PERES, L. Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 215, p. 213-224, 2003.

BEATON, C.B. Ultrafiltration and reverse osmosis in the dairy industry – As introduction to sanitary considerations. **Journal of Food Protect**, v. 42, n.7, p. 584-590, 1979.

BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLOM, W.C.A.; MANLEY, M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compound: I vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation. **Food Chemistry**, v. 90, p. 569-577, 2005.

BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 15-27, 1999.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, n. 26, p. 1199-1200, 1958.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensm-Wiss Technology**, v. 30, n.6, p. 609-615, 1997.

BORGES, A.L.; FANCELLI, M.; RITZINGER, C.H.S.P.; REINHARDT, D.H.; SILVA, N.M.B.; TRINDADE, A.V.; SOUZA, L.S. **Aspectos gerais da produção orgânica de frutas. In: Alimentos Orgânicos: produção, tecnologia e certificação.** Stringheta e Muniz. Editora UFV, Viçosa, p. 236-288, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Leis, Decretos, etc. **Instrução Normativa nº 1** de 07 de Janeiro de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpas e Sucos de Frutas, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. D.O.U. - Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de Janeiro de 2000. Seção I, p. 54-58.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 12**, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. D.O.U. – Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de Janeiro, 2001.

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**, p. 187-191, 2005.

BRESLAU, B.R.; WEN, S.K.; FANG, T.T. Ultrafiltration cuts fruit juices processing cost. Pro-Biotech-Processes - **Suppl. Proc. Biochemistry**, v. 16, p. 52-58, 1984.

BRUIJN, J.; VENEGAS, A.; BORQUES, R. Influence of crossflow ultrafiltration on membrane fouling and Apple juice quality. **Desalination**, v. 148, p. 131-136, 2002.

CALDERON-MIRANDA, M.L.; GONZÁLEZ, M.F.S.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; SWANSON, B.G. Métodos no térmicos para processamiento de alimento: variables y inactivación microbiana. **Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v.1, p. 3-11, 1998.

CARO, A.D.; 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, n. 1, p. 99-105, 2004.

CARRIJO, M.C.G.R.; ROCHA, H.J. **Produtos Orgânicos: Conferência Virtual Global sobre Produção Orgânica de Bovinos de Corte**. Embrapa, SC, 2002.

CARVALHO, L.M.J.; SILVA, C.A.B.; PIERUCCI, A.P.T.R. Clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by ultrafiltration and microfiltration: physicochemical evaluation of clarified juices, soft drink formulation, and sensorial evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2185–2189, 1998.

CARVALHO, L.M.J.; GAVA, J.R.; ABADIO, F.D.B. Commercial sterilization of fruit juices by ultrafiltration/microfiltration membranes. **Alimentaria**, v. 333, p. 123–129, 2002.

CARVALHO, L.M.J.; DELIZA, R.; SILVA, C.A.B.; ANTUN, M.C.; MIRANDA, R.M. Identifying the adequate process conditions by consumers for the pineapple juice using membrane technology. **Journal of Food Technology**, v. 1, n. 4, p. 150-156, 2003.

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

CARVALHO, L.M.J.; CASTRO, I.M.; SILVA, C.A.B. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L.Merril) y micro and ultrafiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p. 447 – 454, 2008.

CASSANO, A.; DRIOLI, E.; GALAVERNA, G.; MARCHELLI, R.; DI SILVESTRO, G.; CAGNASSO, P. Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. **Journal of Food Engineering**, v. 57, p.153-163, 2003.

CASSANO, A.; JIAO, B.; DRIOLI, E. Production of concentrated kiwifruit juice by integrated membrane process. **Food Research International**, v. 37, p. 139-148, 2004.

CASSANO, A.; MARCHIO, M.; DRIOLI, E. Clarification of bood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. **Desalination**, v. 212, p. 15-27, 2007.

CASTRO, M.V.; OLIVEIRA, J.P.; JUNIOR, M.J.M.; ASSUNÇÃO, E.A.O.; BRASIL, A.P.; RABELO, F.L.A.; VALE, C.H.B. Análise química, físico-química e microbiológica de sucos de frutos industrializados. **Diálogo e Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**, n. 12, 2007.

CASTRO, T.R.; ABREU, F.A.P.; CARIOCA, J.O.B. Obtenção de suco clarificado de caju (*Anacardium occidentale*, L) utilizando processos de separação por membranas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 2, p. 164-168, 2007.

CAVALCANTE, A.A.C.M.; LEITE, A.S.; SALVADOR, M.; RUBENSAM, G.; HENRIQUES, J.A.P. Compostos fenólicos, carotenos e vitamina C na atividade antioxidante do suco de caju e da cajuína. **I CONEPI**, 2006.

CHAO, H.W.; WEN, S.K.; FANG, T.T. Influência da ultrafiltração e da osmose reversa na qualidade do suco de maracujá (*Passion fruit*) concentrado **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 413-431, 1992.

CHARITY, R.B. Fruticultura Orgânica. **Agroecologia Hoje**. Botucatu, v. 2, n. 9, p. 16-18, 2001.

CHERYAN, M. Ultrafiltration Handbook. **Technomic Publishing Company**, Inc. 375p., 1986.

CHITARRA, M.I.F. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras, MG: FAEP, 230p., 1990.

CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer's disease. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 621-629, 2000.

CIANCI, F.C.; SILVA, L.F.M.; CABRAL, L.M.C.; MATTA, V.M.. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 579-583, 2005.

CINTRA, R.M.G.; MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos *in vitro* e *in vivo*. **Nutrire**, v.22, p. 49-62, 2001.

CLARO, L.M. **Ação *in vitro* das vitaminas C e E em eritrócitos humanos submetidos à sobrecarga oxidativa induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina**. 2002. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Paraná, Curitiba.

COELHO, Y.S. Lima ácida 'Tahiti' para exportação: aspectos técnicos da produção. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais. Brasília: EMBRAPA – SPI.(**Série Publicações Técnicas FRUPEX**), 35p., 1993.

CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, v. 91, p. 113-121, 2005.

COURI, S.; ALTER, P.; ABREU, F.A.P.; REY NES, M.; BRILLOUET, J.M. **Propriedade antioxidante de cinco variedades de pendúnculo de cajueiro anão precoce**. In: ENAAL, 2003, Rio de Janeiro. Anais. São Paulo: SBAAI, v.1, 214p., 2003.

CRUZ, M.C.M.; SIQUEIRA, D.L.; SALOMÃO, L.C.C.; CECON, P.R. Influência do paclobutrazol e da temperatura ambiente sobre o florescimento e frutificação da limeira ácida 'Tahiti'. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 141-152, 2008.

DAROLT, M.R. **As Principais Correntes do Movimento Orgânico e suas Particularidades.** Disponível em: www.planetaorganico.com.br/trabdurolt.htm. Acesso em: Maio/2005.

DAROLT, M.R. Comparação entre a qualidade do alimento orgânico e do convencional. In: **Alimentos Orgânicos: produção, tecnologia e certificação.** Stringheta e Muniz. Editora UFV, Viçosa, p. 289-312, 2003.

DAROLT, M.R. **Agricultura Orgânica: inventando o futuro.** Londrina: IAPAR, 2002, 250p.

DE PAULA, M.J.; LISSI, C.V.; MONTEIRO, B.F.; VENILDES, H.R. Melhoria na eficiência da clarificação de suco de maracujá pela combinação dos processos de microfiltração e enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n.2, p. 311-324, 2004.

DHUIQUE-MAYER, C.; CARIS-VEYRAT, C.; OLLITRAULT, P.; CURK, F.; AMIOT, M.J. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2140-2145, 2005.

DIAZ, M.N.; FREI, B.; KEANEY, J.F. Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. **New England and Journal Medicine**, v. 337, n.6, p. 408-416, 1997.

DOS SANTOS, G.M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; COSTA, J.M.C.; FIGUEIREDO, R.W.; PRADO, G.M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.58, n. 2, p. 187-192, 2008.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno / ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

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

ESPAMER, L.; PAGLIERO, C.; OCHOA, A.; MARCHESE, J. Clarification of lemon juice using membrane process. **Desalination**, v. 200, p. 565-567, 2006.

FANTOZZI, P.; MONTEDORO, G. Dosage des composés phénoliques dans lés dropes d'olives à différents stades de maturation. **Industry Alimentaria Agriculture**, v. 95, p. 1335-1339, 1978.

FAO - **FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION**. Committee on Commodity Problems, Intergovernmental Group on Citrus Fruit, Thirteenth Session, Projections of World Production and Consumption of Citrus to 2010, Havana, Cuba, p. 20-23, 2003.

FAO - **FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION**. FAOSTAT Statistics database, Agriculture, Rome, Italy, p. 52-58, 2008.

FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of grapefruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1035-1040, 1999.

FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **Journal of Biology Chemistry**, v. 73, p. 627-650, 1927.

FRANCHI, M.A.; LEVY, P.; CRISTIANINI, M. Ultra high pressure homogenization of Orange juice to control spoilage lactic acid bacteria and *Escherichia coli* effect of multiple treatments. In: **International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology**, (3), 2004, Rio de Janeiro. Book of Abstracts, 118p., 2004.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

GALAVERNA, G.; DI SILVESTRO, G.; CASSANO, A.; SFORZA, S.; DOSSENA, A.; DRIOLI, E.; MARCHELLI, R. New integrated membrane process for the production of concentrated blood Orange juice: effect on bioactive compounds and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1021-1030, 2008.

GAO, L.; BEVERIDGE, T.; REID, C.A. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologic**, v. 30, n. 1, p. 23-29, 1997.

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

GIADA, M.L.R. **Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédone da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada**. 2005, 206p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

GIASSON, B.I. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Biological Medicine**, v. 32, p. 1264-1275, 2002.

GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.T.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M.; KADER, A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4581-4589, 2000.

GIRARD, B.; FUKUMOTO, L.R. Apple juice clarification using microfiltration and ultrafiltration polymeric membranes. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**. v. 32, n. 5, p. 290-298, 2000.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: Processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre, Ed. Universidade, Universidade do Rio Grande do Sul, 653p., 2000.

GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; HARUENKIT, R.; CHUTHAKORN, R.; GRAUER, F.; MARTÍN-BELLOSO, O.; TRAKHTENBERG, S. Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 367-371, 1999.

GUARDIOLA, J. L.; GARCIA-LUIS, A. Thinning effects on citrus yield and fruit size. **Acta Horticulturae**, Wazeningen, p. 209-217, 1998.

GUIHUA XU, A.B.; DONGHONG, L.; JIANCHU, C.; XINGQIAN, Y.; YAQIN, M.; JOHN, S. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food Chemistry**, v. 106, p. 545-551, 2008.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. **Processos de separação com membranas**. Escola piloto em engenharia química. Programa de Engenharia Química. COPPE/UFRJ, 2003, 212p.

HABERT, A.C.; NOBREGA, R.; BORGES, C.P. **Processos de separação com membranas**. E. Papers, 2ª edição, p. 126, 2006.

HAKIMZADEH, V.; RAZAVI, S.M.A.; PIROOZIFARD, M.K.; SHAHIDI, M. The potential of microfiltration and ultrafiltration process in purification of raw sugar beet juice. **Desalination**, v. 200, p. 520-522, 2006.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1815-1821, 2002.

IBD - **INSTITUTO BIODINÂMICO**. Diretrizes para o padrão de qualidade orgânico. 17ª Edição, Doc. 812, Botucatu, São Paulo, 2009.

IFOAM - **International Federation of Organic Agriculture Movements** – Normas básicas de IFOAM para produção e processamentos de orgânicos. Agosto, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3ª ed., São Paulo, v.1, 533 p., 1985.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology Medicine**, v. 30, n. 4, p. 433-446, 2001.

ITOUA-GASSAYE, S; DAVIN, A & MIETTON-PEUCHOT, M. Facteurs influencant la retention des aromes en filtration tangentielle des jus de fruits. **Recents Program Genie Procedes**, v. 5, n. 15, 1991.

JARDINI, F.A. ; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.1, p. 138-147, 2007.

JAYAPRAKASHA, G.K. ; BHIMANAGOUDA, S.P. *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, p. 410-418, 2007.

JIAO, B.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p.303-324, 2004.

JIMENEZ, E.A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.F.S.C. Guava fruit (*Psidium guajava L.*) as a new source of antioxidant dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2000.

JIRATANANON, R.; CHANACHAI, A. A study of fouling in the ultrafiltration of passion fruit juice. **Journal of Membrane Science**, v. 111, p. 39-48, 1996.

KATSUBE, N.; LINNALON, M.H.; GSIDIJOU, L.J.; NAVISDY, K.E.; BIANKI, M.C. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 68-75, 2003.

KELEBEK, H.; SELLI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of Orange juice and Orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, v. 91, p. 187-192, 2009.

KOLEVA, I.I.; BEEK, T.A.; LINSSEN, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v.13, n.1, p. 8-17, 2002.

KOROKNAI, B.; CSANÁDI, Z.; GUBCZA, L.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Preservation of antioxidant capacity and flux enhancement in concentration of red fruit juices by membrane processes. **Desalination**, v. 228, p. 295-301, 2008.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n. 4, p. 726-732, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LAORKO, A.; LI, Z.; TONGCHITPAKDEE, S.; CHANTACHUM, S.; YOURAVONG, W. Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 514-521, 2010.

LAUBLI, M.W.; BRUTTEL, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOAC Cd 12-57) and the

Rancimat method. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 63, n.6, p. 792-795, 1986.

LOOTS, D.T.; VAN DER WESTHUIZEN, F.H.; JERLING, J. Polyphenol composition and antioxidant activity of kei-apple (*Dovyalis caffra*) juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1271-1276, 2006.

LORENZI, H.; SARTORI, S.; BACHER, L.B.; LACERDA, M. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**. São Paulo, Brasil, 2006, 581p.

MALDONADO, J. Membranas e processos de separação. **Instituto Nacional de Tecnologia**, Rio de Janeiro, 1991.

MANACH, C.; GIUSSANI, M.J.; MORELLINE, R.P.; SCALZO, L.R.; NANI, R.C.; TORREGGIANI, D. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**. V. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARÍN, 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 Chemistry**, v. 78, p. 319-324, 2002.

MARINOVA, E.M.; YANISHILIEVA, N.V. Antioxidant activity and mechanisms of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v.81, n.2, p. 189-197, 2003.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de La dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, p. 5-18, 2000.

MARX, F.; LICHTENTHALER, R.; RODRIGUES, S.R.B.; PAPAGIANNPOULOS, M.; MAIA, J.G.S. Evaluation of the total oxidant scavenging capacities of açai (*Euterpe oleracea*) and cashew apple (*Anacardium occidentale*) juices and identification of the active compounds by. LC – MS. In: **SLACA**, 5. ed., 2003, Campinas: UNICAMP, 2003.

MATHEW, S.; ABRAHAM, E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. **Food Chemistry**, v. 62, n.4, p. 415-423, 2005.

MATTA, V.M.; MORETTI, R.H.; CABRAL, L.M.C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 477-482, 2004.

MAZZUZ, C. F. Calidad de frutos cítricos: manual para su gestion desde la recoleccion hasta la expedición. **Ediciones de Horticultura**, Barcelona, España, 317p., 1996.

MCCORD, J.M. Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition. **Food Technology**, v. 48, n.3, p. 106-110, 1994.

MENDONÇA, L.M.V.L.; CONCEIÇÃO, A; PIEDADE, J.; CARVALHO, V. D.; THEODORO, V. C. A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia*, Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 870-874, 2006.

MENEZES, F.S.; VICENTINO, A.R.R. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácia com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.27, n.3, p. 384-387, 2007.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.48, p. 576-599, 2000.

MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 282-290, 2008.

MICHAELS, A.S. Ultrafiltration: an adolescent technology. **Food Chemistry**, p. 36-46, 1981.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 48, 91p., 1971.

MIRSAEEDGHAZI, H.; MOUSAVI, S.M.; DJOMEH, Z.E.; REZAEI, K.; AROUJALIAN, A.; NAVIDBAKHSH, M. Comparison between ultrafiltration and microfiltration in the clarification of pomegranate juice. **Journal of Food Engineering**, submetido para publicação, 2010.

MONDELLO, L.; COTRONEO, A.; ERRANTE, G.; DUGO, G.; DUGO, P. Determination of anthocyanins in blood Orange juices by HPLC analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 191-195, 2000.

MORESI, M.; LO PRESTI, S. Present and potential applications of membrane processing in the food industry. **Italian Food and Beverage Technology**, v.36, p. 11-33, 2004.

MORTON, L.W., CACCETTA, R.A., PUDDEY, I.B., CROFT, K.D. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 152-159, 2000.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NUÑEZ, M.J.; PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MOYER, R.A.; THEODULOZ, C.; RODRÍGUEZ, J.A.; CALIGARI, P.D.S.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Anthocyanins, phenolics and antioxidants capacity in diverse small fruits. *Vaccinium, Rubus* and *Ribes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 519-525, 2002.

MULDER, M. Basic Principles of Membrane Technology. Netherlands, **Kluwer Academic Publishers**, 1991.

NENADIS, N.; WANG, L.F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H.Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4669-4674, 2004.

NILSSON, L.S. Protein fouling of UF membrane: Causes and consequences. **Journal of Membrane Science**, v. 56, p. 13-28, 1990.

NUNES, S.P. Preparação de membranas. I Escola Latino-Americana de Processos com Membranas. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, São Paulo, 186p., 1994.

OLIVEIRA, J. C.; SETTI-PERDIGÃO P.; SIQUEIRA, K. A. G.; SANTOS A. C.; MIGUEL, M. A. L. Características microbiológicas do suco de laranja *in natura*. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 241-5, 2006.

ONSEKIZOGLU, P.; BAHCECI, K.S.; ACAR, M.J. Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment. **Journal of Membrane Science**, v. 10, n. 18, p. 1016- 1022, 2010.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; KOLNIAR, J. Effect of enzymatic mash treatment and storage on phenolic composition, antioxidant activity and turbidity of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7078-7085, 2009.

OU, B.; WOODILL, M.H.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; WOODILL, M.H.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

OZGEN, M.; REESE, R.N.; TÚLIO JR., A.Z.; SCHEERENS, J.C.; MILLER, A.R. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1151-1157, 2006.

PEDRÃO, M.R.; BELEIA, A.; MODESTA, R.C.D.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Estabilidade físico-química e sensorial do suco de limão Tahiti natural e adoçado, congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p. 46-52, 1999.

PEDROSO, P.R.; PAGANI, M.M.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; MATTA, V.M. Comparação da microfiltração com membranas de cerâmicas com sistema Koch no suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n.1, p. 125-129, 2007.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D. Total antioxidant capacity of plant foods beverages and oils consumed en Italy assessed by three different in vitro assays. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2812-2819, 2003.

PELLEGRINI, P.B.; MURAD, A.M.; SILVA, L.P.; SANTOS, S.C.P.; COSTA, F.T.; TAGLIARI, P.D.; BLOCH Jr., C.; NORONHA, E.F.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. **Peptides**, v. 29, p.1271-1279, 2008.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.7, p. 1035-1042, 2000.

PINHEIRO, A.M.; FERNANDES, A.G.; FAI, A.E.C.; PRADO, G.M.; SOUZA, P.H.M.; MAIA, G.A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 98-103, 2006.

POZO-INSFRAN, D.D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539-1545, 2004.

PRIOR, R.L.; CAO, G.H. In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology Medicine**, v. 27, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, R.L.; CAO, G.H. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. **Journal of AOAC International**, v. 83, p. 950-956, 2000.

PROTEGGENTE, A.R.; SAIJA, A.; PASQUALE, A.; RICE-EVANS, C.A. The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from Sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties. **Free Radical Research**, v. 37, p. 681-687, 2003.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAI, P.; MAJUNDAR, G.C.; GUPTA, S.D.S. Effect of various pretreatment methods on permeate flux and quality during ultrafiltration of mosambi juice. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 631-638, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 15-20, 2006.

RAPISARDA, P.; BIANCO, M.L.; PANNUZZO, P.; TIMPANARO, N. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of Five Orange genotypes (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Postharvest Biology and Technology**, v. 49, p. 348-354, 2008.

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

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine**, New York, v. 20, n.7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUES, S. L. C.; MOREIRA, R. L. S.; CARDOSO, M. H.; MERÇON, F. Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 98-101, 2003.

ROESLER, R., CATHARINO, R.R.; MALTA, L.G.; EBERLIN, M.N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, 110, p. 711-717, 2008.

SÁ, I.S.; CABRAL, L.M.C.; MATTA, V.M. Concentração de suco de abacaxi através dos processos com membranas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 53-62, 2003.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 270-276, 1998.

SELLAPAN, S. AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2432-2438, 2002.

SCAPIARI, A.C.; FERNANDES, M.H.; POLINTO, B.J. Caracterização do suco de limão galego (*Citrus aurantifolia*) produzido em três localidades da cidade de Limoeiro do Norte – CE. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 62-66, 2008.

SCHNEIDER, T.; CZECH, B. Fruit juice processing – a view to advanced strategies. **Fruit Processing**, 10: 302-306, 1994.

SDA - **SECRETARIA DE ORIGEM ANIMAL**. Instrução Normativa nº 7 de 17 de maio de 1999. DOU – Diário Oficial da União. Rio de Janeiro, 19 de Maio de 1999, seção I, p.11. Disponível em: www.agricultura.gov.br

SHI, J.L.; LI, Y.R.; CHENG, J.F. Application of ultrafiltration to clarification of kiwifruit juice. **Science and Technology of Food Industry**, p. 64-68, 2002.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SIMIRGIOTIS, M.J.; THEODULOZ, C.; CALIGARI, P.D.S.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. **Food Chemistry**, v. 113, p. 377-385, 2009.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.H.; EL BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal Pharmacology**, v. 500, p. 299-313, 2004.

STRINGHETA, P.C.; MUNIZ, J.N. **Alimentos orgânicos: produção, tecnologia e certificação**. Editora UFV. Viçosa, p. 452, 2003.

SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 853-876, 2001.

TRIBESS, T.B. **Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado**, 2003, 92p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLoux, M. & REYNES, M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using cross flow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 83-90, 2001.

VAILLANT, F.; CISSE, M.; CHAVERRI, M.; PEREZ, A.; DORNIER, M.; VIQUEZ, F.; DHUIQUE-MAYER, C. Clarification and concentration of melon juice using membrane processes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 213-220, 2005.

VARGAS, P.N.; HOELZEL, S.C.; ROSA, C.S. Determination of total polyphenols content and antioxidant activity in commercial grape juices. **Alimentar Nutrition**, v.19, n.1, p. 11-15, 2008.

VAYA, J.; AVIRAM, M. Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. **Medicine Chemistry and Endocrinology Metabolism Agents**, v. 1, p. 99-117, 2001.

VENTURINI FILHO, W.G.; DORNIER, M. & BELLEVILLE, M. Tangential microfiltration of orange juice in bench pilot. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 330 – 336, 2003.

VILLAÑO, D., FERNANDEZ, P.M.S., TRANCOSO, A.M., GARCIA, P.M.C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. **Talanta**, v. 64, p. 501-509, 2004.

VILLAÑO, D., FERNANDEZ, P.M.S., MOYÁ, M.L.; TRANCOSO, A.M., GARCIA, P.M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, p. 230-235, 2007.

WETTASINGHE, M.; BOLLING, B.; PLHAK, L.; PARKIN, K. Screening for phase II enzyme inducing and antioxidant activities of common vegetables. **Journal of Food Science**, v.67, n. 7, p. 2583-2588, 2002.

YASAN, H.; ZHIJUAN, J.; SHUNXIN, L. Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p. 366-373, 2007.

YOO, K.M.; LEE, K.W.; PARK, J.B.; LEE, H.J.; HWANG, I.K. Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of yuzu (*Citrus junus Sieb ex Tanaka*) during maturation and between cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5907-5913, 2004.

ZENG, F.K.; HU, Y.F.; WU, Y.X. Effects of ultrafiltration on the quality of fruit and vegetables juices. **Food and Fermentation Industries**, v. 25, n. 2, p. 31-34, 1999.

ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2008-2016, 2000.

ZIENA, H.M.S. Quality attributes of Bears Seedless lime (*Citrus latifolia*, Tanaka) juice during storage. **Food Chemistry**, v.71, p.167-172, 2000.