

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM LIMA  
ÁCIDA (*Citrus latifolia*, Tanaka), CV. TAHITI, OBTIDA POR  
CULTIVO CONVENCIONAL E CULTIVO BIODINÂMICO**

**Renata Borchetta Fernandes Fonseca**

**Rio de Janeiro  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM LIMA ÁCIDA (*Citrus latifolia*, Tanaka), CV. TAHITI, OBTIDA POR CULTIVO CONVENCIONAL E CULTIVO BIODINÂMICO

Renata Borchetta Fernandes Fonseca

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Profa. Dra. Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Rio de Janeiro

Março, 2007

IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM LIMA ÁCIDA (*Citrus latifolia*, Tanaka), CV. TAHITI, OBTIDA POR CULTIVO CONVENCIONAL E CULTIVO BIODINÂMICO

Renata Borchetta Fernandes Fonseca

Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovado por:

---

Profa. Dra. Lucia Maria Jaeger de Carvalho  
Orientador

---

Profa. Dra. Cristiana Pedrosa Melo Porto  
Revisor

---

Pesquisador Dr. Antônio Gomes Soares

---

Profa. Dra. Gisela Maria Dellamora Ortiz

---

Profa. Dra. Mirian Ribeiro Leite Moura  
Suplente

---

Profa. Dra. Eliane Fialho de Oliveira  
Suplente

Rio de Janeiro

Março, 2007

Fonseca, Renata Borchetta Fernandes

Identificação de substâncias voláteis em lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, obtida por cultivo convencional e cultivo biodinâmico / Renata Borchetta Fernandes Fonseca. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2007.

66 f. : il.; 31 cm.

Orientador: Lucia Maria Jaeger de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2007.

Referências bibliográficas: f. 59-66

1. Citrus. 2. Bebidas – análise. 3. Óleos voláteis – análise. 4. Microextração em fase sólida – métodos. 5. Cromatografia de gases e Espectrometria de massa – métodos. 6. Agricultura. 7. Agricultura orgânica. 8. Nutrição - Tese. I. Carvalho, Lucia Maria Jaeger de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

À minha filha Clarissa, que com sua inocência, me renova a cada dia incentivando-me sempre a continuar esta caminhada e a buscar novos horizontes.

Ao meu marido Renato e a minha mãe Linda, pessoas essenciais em minha vida e que desde o início me acompanharam, me apoiaram, colaboraram e compreenderam com respeito e amor os momentos mais difíceis desta caminhada.

À minha orientadora Lucia, que nos momentos mais difíceis teve tranquilidade e perseverança e me apoiou, confiou em mim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido que eu vencesse mais esta árdua etapa.

À minha filha, meu marido, minha mãe por todo apoio e atenção que me foram dados durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e familiares e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À minha orientadora, professora e amiga Lucia, por toda colaboração e compreensão para a concretização deste, e ao seu marido o pesquisador José Luiz Viana de Carvalho, que teve paciência nos momentos em que ela esteve ausente para que este trabalho fosse realizado, pois sem ela tudo se tornaria mais difícil.

Aos colegas, alunos da graduação, bolsistas da iniciação científica (Carlos Eduardo, Jéssica, Alyne, Juliane, Tatiana) que ajudaram e ainda ajudam neste projeto.

Ao pesquisador Humberto Bizzo e à Andrezza (EMBRAPA), pela orientação e execução das análises.

Aos meus colegas, professores e funcionários do curso de mestrado, em especial os amigos Gizene Luciana, Carol, Daniela e Alcides Ricardo.

Ao Roberto, produtor da lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. tahiti, biodinâmica de produção certificada pelo IFOAM, pelas doações da matéria-prima para o desenvolvimento da presente dissertação, acreditando nesta pesquisa.

## RESUMO

Tendo em vista o interesse cada vez maior pelo consumo de alimentos mais saudáveis e com características de sabor e aroma semelhantes ao alimento "in natura", avaliou-se, na presente dissertação, as substâncias voláteis presentes em sucos de lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, de cultivo convencional e biodinâmico, a fim de observar possíveis diferenças. A microextração em fase sólida (MEFS) com *headspace* foi utilizada por ser um método rápido na análise destas substâncias em alimentos. Foram utilizadas cinco microfibras: polidimetilsiloxano (PDMS); poliacrilato (PA); polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB); carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) e carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB), para que fosse selecionada a de melhor eficiência quanto à extração das substâncias voláteis em sucos, pela técnica de MEFS com *headspace*. As microfibras selecionadas foram PDMS/DVB e PDMS por apresentarem nos cromatogramas, o maior número de substâncias adsorvidas. A fim de que se verificasse a influência da presença de sal na eficiência da extração, adicionou-se 0,2 g de NaCl às amostras e avaliou os tempos de 30 e 60 minutos de estabilização, verificando-se que a microfibra de PDMS/DVB, no tempo de 30 minutos de estabilização adsorveu o maior número de substâncias voláteis. As substâncias voláteis foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CGAR/EM) e a identificação das substâncias voláteis foi realizada pela comparação de seus espectros de massa com a espectroteca Wiley e os índices de retenção calculados, comparados aos da literatura. A quantificação foi realizada por CGAR com injeção das amostras e co-injeção de octanoato de etila nas mesmas condições cromatográficas. O limoneno foi a substância volátil mais abundante (42,0µg/g), resultado este esperado e, tanto no suco de lima ácida biodinâmica quanto no convencional, as substâncias responsáveis pelo *flavor* como o neral e o geranial foram encontradas nas concentrações 0,23µg/g e 0,35µg/g, respectivamente. Sendo a lima ácida de cultivo biodinâmico, produto de tecnologia agrícola limpa, isenta de agroquímicos e tendo apresentado o mesmo perfil de aroma daquela obtida por cultivo convencional, pode ser uma alternativa viável em benefício da saúde, visto já ser cultivada comercialmente.

Palavras-chave: lima ácida; MEFS/CG/EM; substâncias voláteis; cultivo biodinâmico; cromatografia gasosa/espetrometria de massa; microfibras.



## ABSTRACT

In view of more and more interest in the consumption of healthier food and with flavour and aroma characteristics to those “in natura” raw materials, it has been evaluated in the present dissertation the volatile substances present in acid lime juice (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, in conventional and biodynamical cultivation in order that possible differences in compounds could be observed. The solid-phase micro extraction in (SPME) with *headspace* was used by being a fast method in the analysis of these compounds in food. Five microfibres were used: polydimethylsiloxane (PDMS), polyacrylate (PA), polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PMDS) and carbowax/divinylbenzene (CW/DVB), so that to select the one of better efficiency in relation to the extraction of the volatile substances present in juices, by the MEFS technique with *headspace*. The selected microfibres were PDMS/DVB and PDMS for presenting in the chromatograms the largest number of absorbed volatile compounds. In order to be verified the influence of salt in the efficiency of the extraction, it was added 0,2g of sodium chloride (NaCl) to the samples and were evaluated the times of 30 to 60 minutes for the stabilization, being verified that the PDMS/DVB microfibres, in the 30 minute time of stabilization, absorbed the largest number of volatile compounds. The volatile compounds were analyzed by gaseous chromatography coupled to the mass spectrometry (HRGC/MS) and the identification of the volatile compounds was accomplished by the comparison of its mass spectrum data with the Wiley spectrotec and the calculated retention indexes, compared to that of literature values. The quantification was accomplished by HRGC with injection of samples and co-injection of ethyl octanoate (internal pattern) in the same chromatographical conditions. The limonene was the major abundant volatile compound (42,0 µg/g), as expected and, so much in the biodynamical acid lime juice as in the conventional, the flavour compounds as the neral (0,23 µg/g) and the geranial (0,35 µg/g) were identified. Being the acid lime of biodynamical cultivation, product of clean agriculture technology, free from pesticides and having presented the same profile of aroma of that obtained by conventional cultivation, it can be a viable alternative in the benefit of the human health as it is already cultivated commercially.

Keywords: Acid lime; SPME/GC/MS; volatile compounds; biodynamical cultivation; gas chromatography/mass spectrometry; microfibres.

<b>LISTA DE QUADROS, FLUXOGRAMAS, TABELAS, ESQUEMAS E FIGURAS</b>	
	<b>página</b>
<b>Quadro 1. Composição do suco de limão integral, do limão com e sem casca</b>	<b>22</b>
<b>Quadro 2. Substâncias voláteis em limão cultivado na Tunísia</b>	<b>26</b>
<b>Fluxograma 1. Obtenção do suco de lima ácida</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 1. Microfibras utilizadas na 1ª etapa das análises</b>	<b>35</b>
<b>Esquema 1. Microextração em Fase Sólida (MEFS)</b>	<b>36</b>
<b>Esquema 2. MEFS para a adsorção das substâncias voláteis</b>	<b>37</b>
<b>Esquema 3. Parâmetros para a seleção entre as microfibras de PDMS/DVB e PDMS</b>	<b>38</b>
<b>Quadro 3. Rendimento dos sucos de lima ácida convencional e biodinâmica</b>	<b>39</b>
<b>Figura 1. Substâncias voláteis de suco de lima ácida (biodinâmico) extraídas por MEFS, em 30 minutos, sem adição de sal, em microfibra de PDMS/DVB</b>	<b>41</b>
<b>Figura 2. Substâncias voláteis de suco de lima ácida (biodinâmico) extraídas por MEFS, em 30 minutos, sem adição de sal, em microfibra de PDMS</b>	<b>42</b>
<b>Quadro 4. Substâncias adsorvidas do suco de lima ácida na MEFS com PDMS/DVB e PDMS</b>	<b>46</b>
<b>Figura 3. Cromatograma das substâncias voláteis da amostra de suco de lima ácida (biodinâmico) extraídos por MEFS, em 30 minutos, com adição de sal, em microfibra de PDMS/DVB</b>	<b>47</b>
<b>Figura 4. Cromatograma das substâncias voláteis da amostra de suco de lima ácida (biodinâmico) extraídos por MEFS, em 60 minutos, com adição de sal, em microfibra de PDMS/DVB</b>	<b>48</b>
<b>Quadro 5. Identificação das substâncias voláteis dos sucos de lima ácida convencional e biodinâmica</b>	<b>51</b>
<b>Figura 5. Espectros de massa do limoneno no suco de lima ácida convencional e da espectroteca Wiley</b>	<b>52</b>
<b>Figura 6. Espectro de massa do neral no suco de lima ácida convencional e da espectroteca Wiley</b>	<b>53</b>
<b>Figura 7. Espectro de massa do geranial no suco de lima ácida convencional e espectroteca Wiley</b>	<b>54</b>
<b>Quadro 6. Quantificação das substâncias voláteis nos sucos de lima ácida por cultivo convencional e biodinâmico</b>	<b>56</b>

# SUMÁRIO

Página

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Agricultura Orgânica Biodinâmica.....	17
2.2 Qualidade Orgânica Através da Certificação.....	19
2.3 Composição Média do Limão/Lima Ácida ( <i>Citrus latifolia</i> , Tanaka), cv. Tahiti..	20
2.4 Formação de Substâncias Voláteis, Principalmente em Limão/Lima Ácida.....	22
2.5 Métodos de Extração e Adsorção.....	27
2.6 Microextração em Fase Sólida na Adsorção de Voláteis em Matérias - Primas e Produtos de Origem Vegetal.....	28
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 Objetivo Geral.....	32
4.2 Objetivos Específicos.....	32
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
5.1 Preparo do Solo para Cultivo da Lima Ácida Biodinâmica.....	33
5.2 Matérias-Primas.....	33
5.3 Obtenção do Suco de Lima Ácida.....	33
5.4 Delineamento Experimental.....	34
5.5 Rendimento.....	35
5.6 Metodologia Analítica.....	35
5.7 Seleção da Microfibras de Melhor Eficiência (Otimização).....	35
5.7.1. 1ª Etapa.....	35
5.7.2. 2ª Etapa.....	37
5.8 Quantificação das Substâncias Voláteis Identificadas.....	38
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
6.1 Rendimento dos Sucos.....	39
6.2 Seleção da Microfibras de Melhor Eficiência.....	39
6.3 Verificação da Melhoria da Extração com Adição de Sal às Amostras.....	43
6.4 Extração das Substâncias Voláteis com as Microfibras de PDMS/DVB e PDMS..	45
6.5 Identificação e Quantificação das Substâncias Voláteis dos Sucos de Lima Ácida Convencional e Biodinâmica.....	50
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
7.1 Considerações Finais.....	58
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## INTRODUÇÃO

De acordo com Trivellato e Freitas (2003), a agricultura é uma atividade relativamente recente na história da humanidade e surgiu há cerca de 10 mil anos direcionada à obtenção 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 resíduos vegetais e animais ao solo. A introdução da química na produção agrícola ocorreu há menos de 2 (dois) séculos e o desenvolvimento da química juntamente com o desenvolvimento industrial propiciou o surgimento de um modelo de agricultura centrado no uso de insumos químicos (que surgiu em 1840, por Liebig), equipamentos mecânicos e sementes melhoradas, que foi denominada de agricultura convencional.

Atualmente, o cultivo convencional de matérias-primas de origem vegetal, vem sendo questionado, uma vez que se baseia na utilização exaustiva do solo com adição de adubos minerais de alta solubilidade, na utilização de agroquímicos para o controle de pragas, doenças e ervas daninhas, em cultivares de alta resposta a fertilizantes e químicos sintéticos. Engloba um pacote tecnológico dependente de insumos industrializados demandando alto consumo energético, gerando impacto negativo no meio ambiente e no ser humano (Altiere, 2002; Elhers, 1996; Gliessman, 2000). Tem-se, também, que considerar a perda da variabilidade genética, com o plantio de transgênicos resistentes a doenças e pragas, que atingem, diretamente, pequenos produtores, principalmente aqueles de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

Por outro lado, a agricultura orgânica vem desempenhando um papel importante e gradativo quanto à substituição do cultivo convencional. O crescimento do mercado brasileiro, em relação aos produtos orgânicos, tem sido significativo, estimado em 30% no ano 2000, onde frutas e hortaliças representam 2% do total comercializado pelas redes de supermercados no País (Agrianual, 2001). A biodiversidade é a maior aliada deste cultivo, por ser um ecossistema de grande interação, com a menor intervenção possível e, sempre considerando os processos naturais, ou seja, todo alimento cultivado sem agroquímicos ou fertilizantes químicos, é denominado orgânico. Atualmente, os produtos orgânicos atraem cada vez mais adeptos, e sua procura tem aumentado progressivamente, ganhando destaque com a divulgação de sua qualidade, gerando

grande demanda no mercado consumidor, representando 8% de todos os alimentos comercializados no mercado brasileiro (Altiere, 2002; Elhers, 1996; Gliessman, 2000; Zakabi, 2005). De acordo com Oliveira (2006/1), a demanda internacional para este setor cresce cerca de 25% ao ano e os principais compradores são europeus, americanos e japoneses.

O alimento orgânico possui alta qualidade biológica, isento de resíduos de substâncias nocivas à saúde humana, proveniente de sistemas agrícolas de cultivo onde recursos produtivos locais são manejados de forma integrada e harmônica visando a sustentabilidade econômica, ambiental, social e cultural (Borges *et al.*, 2003).

O crescimento da fertilidade e da eficiência do solo na cultura orgânica tem sido significativo, uma vez que é observada maior abundância de microorganismos e outros seres que o beneficiam ([www.fibl.net](http://www.fibl.net)). Tratar o solo como um organismo vivo é oferecer a oportunidade de que agricultores, no futuro, possam produzir e desenvolver suas áreas cultiváveis e colheitas de forma saudável, associadas ao baixo custo, devido à utilização de insumos fornecidos pelo 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, como exemplo no cultivo convencional do tomate (Baeta, 2004).

A atividade dos microrganismos no solo contribui, consideravelmente, para o sistema de produção orgânica, mantendo os recursos não-renováveis e ainda a alta fertilidade, além de uma melhor estrutura do solo. A agricultura orgânica ajuda a manter a biodiversidade do solo, apesar do uso deste, pois não há utilização de fertilizantes e pesticidas químicos. A atividade e a diversidade de microorganismos e sua eficiente utilização das fontes de carbono orgânico no solo são responsáveis pela relevância deste cultivo ([www.fibl.net](http://www.fibl.net)).

O cultivo (sem agroquímicos) acrescido do certificado de qualidade do Instituto Biodinâmico (IBD) garante a forma orgânica biodinâmica de agricultura. A característica mais marcante desse método é a utilização dos preparados biodinâmicos, além de ter um sistema próprio de certificação, fiscalização e credenciamento de produtores com reconhecimento mundial, diferenciando-se dos demais métodos de produção não convencional. A legislação brasileira emprega o termo orgânico num

sentido genérico, para designar produtos provenientes de vários métodos ou sistemas de manejo agrícola (Trivellato e Freitas, 2003).

A evolução da produção de alimentos orgânicos no mundo ocorreu a partir dos anos 70, com a divulgação dos impactos ambientais, perda da biodiversidade, contaminações por resíduos tóxicos relacionados à agricultura convencional. Portanto, desde 1960, verifica-se um grande crescimento da consciência ambientalista e com isso, um maior interesse pelos métodos alternativos de produção ou agroecológicos (Trivellato e Freitas, 2003). Segundo Oliveira (2006/1), atualmente são produzidos mais de 30 tipos de alimentos orgânicos. Cresce a cada dia a procura por esses alimentos, devido à busca pela melhoria da qualidade de vida e de produtos seguros.

Os alimentos, frutas, sucos e néctares de frutas apresentam em sua composição várias substâncias que conferem características especiais de sabor e aroma (Carvalho, 2004). As substâncias voláteis influenciam na qualidade sensorial de frutas frescas ou processadas. As substâncias voláteis podem, ainda, ser utilizadas para melhorar ou padronizar sabores, reconstituir características aromáticas perdidas ou modificadas e até mesmo mascarar sabores e odores indesejáveis do produto final quando utilizadas na indústria. A concentração de substâncias voláteis geralmente baixa ( $\mu\text{g/L}$ ), pode ser afetada por alguns fatores como variedade, condições climáticas, estágio de maturação, colheita, tratamento pós-colheita, armazenamento e as condições de processamento (Riu-Aumatell *et al.*, 2004). O aroma é formado por vários grupos de substâncias químicas como aldeídos, álcoois, cetonas, ésteres, lactonas e terpenos.

Atualmente, as frutas tropicais têm sido pesquisadas com maior intensidade quanto às substâncias voláteis responsáveis por essas características únicas bem como quanto ao seu valor nutricional (Carvalho, 2004).

Cada vez mais, equipamentos sofisticados e sensíveis na detecção, na identificação e quantificação das substâncias voláteis estão sendo desenvolvidos e aperfeiçoados. Técnicas de extração, associadas à utilização desses equipamentos, vêm sendo aprimoradas para que minimizem ou mesmo suprimam etapas nas quais essas substâncias possam ser perdidas ou sofrer transformações, tais como a formação de artefatos químicos (Carvalho, 2004). A rápida análise dos constituintes do aroma pode aperfeiçoar o padrão de qualidade e proporcionar a relação entre a área sensorial e o conteúdo volátil (Riu-Aumatell *et al.*, 2004).

Um dos métodos de extração (adsorção) de voláteis ainda pouco pesquisados na área de alimentos é a microextração em fase sólida (MEFS), sendo considerado extremamente rápido e prático no preparo de amostras a serem analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massa (CGAR/EM). A MEFS dispensa a utilização de solventes tendo como princípio a adsorção das substâncias voláteis por *headspace* ou imersão, em microfibras poliméricas a baixas temperaturas (Pawliszyn, 1997; Carvalho, 2004).

Uma avaliação comparativa do perfil aromático entre mesmas variedades cultivadas de formas diversas é e, deve ser considerada importante tanto para produtores quanto para consumidores e, ainda, para a indústria de sucos. É preocupação na indústria de alimentos, a preservação das substâncias voláteis, responsáveis pelo aroma, uma vez que estas devem apresentar aroma e sabor inerentes ao produto, evitando a adição de aditivos artificiais. Cada vez mais, busca-se a preservação de alimentos, a fim de que não ocorram perdas, mesmo que mínimas, de nutrientes e outros constituintes, tais como aqueles responsáveis pelo aroma e sabor (Carvalho, 2004).

Portanto, objetivou-se identificar as substâncias voláteis extraídas por MEFS, em sucos de lima ácida, cv. Tahiti, integral, obtidos de frutos cultivados em sistemas convencional e biodinâmico, a fim de que se possa avaliar quanto a este parâmetro, a qualidade dos produtos orgânicos biodinâmicos certificados.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os cultivos tradicionais utilizam uma série de compostos químicos na adubação, durante o desenvolvimento do vegetal ocasionando, conseqüentemente, a exaustão do solo. Por outro lado, segundo a Secretaria de Defesa Agropecuária – DAS (1999), o sistema orgânico de produção é todo aquele que adota tecnologias que otimizem os recursos naturais e abrange os denominados cultivos: ecológico, biodinâmico, natural, sustentável, regenerativo, biológico, agroecológico e permacultura.

Os objetivos dos cultivos do sistema orgânico visam o oferecimento de produtos saudáveis com elevado valor nutricional, principalmente, isentos de contaminantes que possam provocar risco à saúde do consumidor, agricultor e/ou meio ambiente, preservando a biodiversidade dos ecossistemas, conservando as condições físicas, químicas e biológicas do solo, da água e do ar e integrando agricultor e consumidor final de produtos orgânicos, incentivando, desta forma sua produção (Borges *et al.*, 2003).

No início do século XX, o cultivo orgânico foi proposto pelo engenheiro agrônomo, inglês Albert Howard que observou a menor incidência de doenças em animais e plantas quando não se utilizava a aplicação de agroquímicos ou fertilizantes químicos quando comparados aos produtos obtidos por cultivo tradicional. Em seus estudos, na Índia, concluiu que o importante para a obtenção de bons resultados era manter a fertilidade do solo, desenvolvendo o método Indore de compostagem, que consiste na transformação de resíduos vegetais e animais em humus que, aplicado na época adequada, restaurava a fertilidade do solo (Bonilla, 1992).

Os requisitos básicos para o cultivo orgânico são: a matéria orgânica responsável pela melhoria da fertilidade e vida do solo, as substâncias húmicas indispensáveis na nutrição vegetal, uma vez que o solo é considerado organismo vivo (necessitando assim, de uma nutrição equilibrada), a associação da produção vegetal e animal, a compostagem em pilhas e a integração entre produtor e produto final. Muito importante é a escolha do método de processamento do solo, que deve ser isento de aditivos químicos. Todo e qualquer produto nele introduzido não deverá ser nocivo ou ter efeito negativo que se perpetue no ambiente, ou seja, sem prejuízo à saúde humana, considerando também as características sensoriais do produto (Borges *et al.*, 2003).



Todos os sistemas não convencionais de produção agrícola podem ser considerados formas de agricultura orgânica, pois as matérias-primas produzidas são passíveis de serem certificadas como orgânicas, desde que preencham os requisitos preconizados pelas normas para a produção orgânica de alimentos. O sistema internacional de credenciamento visa garantir a integridade orgânica do produto, o que requer um sistema regular de inspeção e certificação, visando assegurar a credibilidade dos produtos certificados, garantindo assim, a confiança do consumidor. Por isso, todo produto orgânico deve ser processado de forma que sua característica orgânica seja preservada, oferecendo realmente produtos de qualidade, nutritivos e orgânicos (IBD, 2004).

A produção orgânica beneficia a qualidade dos ecossistemas facilitando assim a conservação da natureza, evitando a degradação dos recursos naturais, pois um de seus princípios gerais é o desenvolvimento dos ciclos da natureza, sendo então utilizado como adubo, o esterco *in natura*. Na década de 1940, o cultivo ou agricultura biológica, idealizada por Hans Muller, biólogo suíço e Hans Peter Rush, médico alemão, enfatiza o processo de compostagem na superfície do solo e testes especiais para avaliar sua fertilidade - método Muller-Rush (Stringheta e Muniz, 2003).

Na década de 1960, Raul Lemaire, geneticista francês e Jean Boucher, biólogo, desenvolveram o método caracterizado pela utilização de pó da alga marinha (*Lithothamne calcareum*), preconizando como requisitos básicos, a determinação da fertilidade do solo através da atividade microbiana, sendo esta a maior responsável pelo fluxo de nutrientes entre os materiais sólidos e a sua solubilidade ou dissolução no solo, utilizando esterco em estado inicial de decomposição, realizada por compostagem laminar, desenvolvendo fontes de energia renováveis, promovendo a saúde das plantas associada à saúde do solo (Stringheta e Muniz, 2003).

A nutrição equilibrada, segundo Raul Lemaire e Jean Boucher, propicia plantas resistentes ao ataque de pragas e doenças enfatizando, também, que a saúde do ser humano depende da qualidade biológica dos alimentos, possuindo forte conotação na comercialização direta e busca a autonomia do produtor (Stringheta e Muniz, 2003).

A agricultura natural busca seguir a natureza e minimizar a interferência humana nos agroecossistemas, evitando assim, o cultivo mecânico do solo e a aplicação de agroquímicos, pelo controle de pragas e doenças, baseado na manutenção das

características naturais do ambiente, melhoria das condições do solo e emprego de produtos naturais não poluentes. As atividades agrícolas devem respeitar as leis da natureza promovendo o mínimo de intervenção no ambiente e nos processos naturais de forma a evitar o desperdício de energia (Borges *et al.*, 2003).

Na natureza, existe a coexistência e benefício mútuo e não há competição, justifica a purificação do espírito pela arte e a do corpo pelo alimento, defendendo a utilização da compostagem laminar com resíduos vegetais, não utilizando esterco. O cultivo natural é fundamentado na atuação de microrganismos: fungos, bactérias, actinomicetos (microrganismos eficazes) que atuam como inoculantes para o solo, plantas e para o composto (Stringheta e Muniz, 2003).

A produção orgânica nacional é destinada principalmente para o abastecimento do mercado interno, porém representa um caminho promissor rumo ao mercado internacional (Agrianual, 2001).

### **Agricultura Orgânica Biodinâmica**

Dentre os cultivos orgânicos inclui-se a agricultura biodinâmica que se diferencia por estar também relacionada à antroposofia (“conhecimento do ser humano”). Foi criada pelo filósofo e matemático austríaco, Rudolph Steiner (1924), que a definiu como “um caminho de conhecimento para guiar o espiritual do ser humano ao espiritual do universo”. De acordo com Steiner, a realidade surge da união do espiritual com o físico, com o objetivo de tornar “mais humano” ao aumentar sua consciência sobre seus pensamentos e ações. Os antropósofos vêem os seres humanos constituídos de corpo, alma e espírito, mas inter-relacionados e não como membros independentes. Uma vertente prática da antroposofia é a agricultura biodinâmica, e ainda segundo Steiner, que procura globalizar todo o sistema associando-o à natureza, às forças cósmicas e definindo a propriedade agrícola como um organismo único em harmonia com seu *habitat*, onde o todo e as partes formam um só conjunto, descartando qualquer possibilidade de monocultura biodinâmica ou orgânica ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Após a conferência de Rudolf Steiner que apresentou a forma holística da natureza, pesquisas investigaram a estrutura das fazendas, o cultivo, a influência dos planetas e constelações e ainda a qualidade nutricional dos produtos ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). O holismo não significa a energia da soma das partes, mas a

sinergia gerada com a captação da totalidade orgânica, uma e diversa em suas partes, mas sempre articuladas entre si dentro da totalidade e constituindo toda essa totalidade (Falconi Filho, 2003). A diversidade é o ponto chave para este tipo de agricultura (Reijntjes *et al.*, 1994), pois os produtos orgânicos são produzidos sem agressões ao meio ambiente, ocorrendo uma grande interação entre o meio.

A agricultura orgânica biodinâmica tem como princípio a utilização de preparados biodinâmicos devidamente certificados e fiscalizados, englobando o credenciamento de produtores com reconhecimento mundial, diferenciando-se dos métodos convencionais de cultivos em vários pontos, considerando:

1 - a interligação e interdependência da propriedade agrícola com a fauna, flora, solo, cursos d'água e o ser humano; 2 - a harmonia do meio ambiente promovida pelo equilíbrio paisagístico e ecológico (plantação de árvores, entre outros), recuperação de áreas com flora nativa; 3 - a interação entre produção vegetal e animal e o aproveitamento dos resíduos na elaboração do composto dentro da propriedade agrícola; 4 - a obediência ao calendário astrológico (cósmico) na semeadura e demais atividades agrícolas; 5 - a utilização de preparados à base de extratos vegetais e de soluções orgânicas e minerais, que incorporados às pilhas de compostagem ou aplicados diretamente sobre o solo e plantas, possuem efeito dinamizador sobre as forças naturais (Stringheta e Muniz, 2003).

As preparações do adubo biodinâmico e sua pulverização, criadas a partir de substâncias naturais e orgânicas são aplicadas em doses diminutas a fim de melhorar e regular o crescimento vegetal, a vida do solo e todo o metabolismo (ciclo biológico). Este método de produção envolve aplicar matéria vegetal (flores de camomila, casca de madeira triturada e flores de dente-de-leão), esterco de gado ou quartzo moído colocando em partes selecionadas de matéria orgânica animal, fermentadas no solo, por aproximadamente seis meses. Quando o processo fermentativo está completo, o material da preparação é separado do material orgânico o qual será distribuído para ser utilizado em pequenas porções. Portanto, os materiais mais utilizados na produção biodinâmica são o esterco em compostagem (70%) adicionado de homeopáticos (Wistinghausen *et al.*, 1998). A compostagem é uma tecnologia antiga e muito eficiente na reciclagem de resíduos e aproveitamento para a geração de substratos para o cultivo de mudas (Borges *et al.*, 2003).

Em 1960, o interesse pela agricultura biodinâmica aumentou, gradativamente e, em 1978 criou-se o Instituto de Pesquisas de Orgânicos (FIBL), o qual compara e diferencia os sistemas biodinâmico, orgânico e convencional. A certificação de alimentos orgânicos e biodinâmicos se dá caso a unidade de produção esteja realmente sob o sistema orgânico. Caso não estiver convertida inteiramente, esta unidade é passível de inspeção até sua total conversão (IFOAM, 2002).

De acordo com Charity (2001), no cultivo orgânico o manejo do solo deve ser direcionado, mantendo-o coberto, com matéria viva e/ou morta, utilizando adubos verdes e compostos, em pilhas ou de forma laminar. A aplicação de adubos orgânicos a solos tropicais, proporciona melhoria das suas propriedades físicas, químicas e biológicas, obtendo-se boas respostas das plantas, devido ao solo fértil que se mantém (Altieri, 2002). O manejo do solo é uma das práticas mais importantes no sistema orgânico. As fases de produção de mudas e manejo da planta necessitam de seu potencial intrínseco e dos microrganismos (Borges *et al.*, 2003).

### **Qualidade Orgânica Através da Certificação**

Devido à importância de manter a qualidade da produção, a confiança do consumidor e a biodiversidade, surgiu a necessidade de padronizar produtos e processos, garantindo a ética da produção, surgindo assim, a certificação. O produto orgânico deve ser certificado, para que seja considerado como tal, justamente porque não apresenta grandes diferenças aparentes quando comparado ao convencional (Zakabi, 2005). O consumidor acaba por preferi-lo devido à ausência de toxicidade que realmente se acredita ter (Ormond *et al.*, 2002).

O produto ganha um selo de qualidade emitido por uma das entidades que monitoram a produção desses alimentos no Brasil, como a Associação de Agricultura Orgânica e o Instituto Biodinâmico, localizados em São Paulo (Sheung *et al.*, 2004). Existem órgãos internacionais de certificação como a Federação Internacional de Movimentos da Agricultura Orgânica - IFOAM e, no Brasil, o Instituto Biodinâmico - IBD que é o único reconhecido pela IFOAM.

Darolt (2003) afirma que o selo de qualidade orgânica é um indicativo de que os alimentos foram produzidos e processados de acordo com as normas orgânicas, significando um adicional em termos de qualidade agrônômica quando comparado ao

alimento convencional, além de oferecer um diferencial de segurança aos consumidores, no sentido de que os alimentos não foram submetidos a radiações ionizantes e que não possuem organismos geneticamente modificados (OGMs) ou transgênicos na sua composição.

De acordo com Nassar (1999), a certificação é 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, conseqüentemente, sua qualidade. A garantia de conhecer a origem do produto e de estar consumindo um alimento seguro para a saúde tornou-se prioridade quando se pensa em qualidade. Os alimentos provenientes do sistema orgânico, identificados com selo de qualidade, são produzidos por um método que respeita o meio ambiente, o produtor e o consumidor (Darolt, 2003). O aumento da garantia da procedência do produto é fundamental, sendo também importante a regulamentação do setor. A população, atualmente, é muito exigente e quer consumir produtos seguros, porém acessíveis.

### **Composição Média do Limão/Lima Ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti**

A lima ácida é um híbrido do limão siciliano com a lima-da-pérsia, motivo pelo qual também recebe o nome de lima ácida. Fruto robusto de formato arredondado, casca lisa ou ligeiramente rugosa de coloração verde, polpa esbranquiçada, muito suculenta e qualidade menos ácida. Nesta variedade as sementes são ausentes, propaga-se por enxertia. No Brasil, tem como base o limão cravo ([www.docelimao.com.br](http://www.docelimao.com.br)). A planta é cultivada principalmente no estado de São Paulo (Barros, 1986).

O limoeiro é um arbusto pertencente a família das Rustáceas, com ramos espinhosos, chegando a atingir de 4 a 5 metros de altura. Os frutos costumam conter farto suco com grande quantidade de ácido cítrico, vitamina C e sais minerais, além de pectina na entrecasca, e óleos monoterpênicos na casca, que é um dos grandes segredos de suas propriedades terapêuticas ([www.docelimao.com.br](http://www.docelimao.com.br)).

De acordo com o site [www.docelimao.com.br](http://www.docelimao.com.br), (acessado em 23/06/2005), os monoterpênicos são as menores moléculas que compõem os óleos de *citrus*, motivo pelo qual penetram com extrema facilidade em todos os tecidos e células do corpo humano, com uma poderosa ação solvente de lipídios. O monoterpêneo presente em maior teor

nestes óleos é o d-limoneno, que possui propriedades anticancerígenas, entre outras. Segundo Carter (1979), a procura pela melhoria da qualidade do limão e a popularidade do suco, inclusive para uso medicinal, fez dele a 1ª fruta processada a ser comercializada.

De acordo com o *Foreign Agriculture Service* entre 1984 e 1989, a produção de limão em alguns países como: Estados Unidos, Itália, Espanha, Argentina, Turquia, Grécia, Chile, África do Sul, Israel, Uruguai, Austrália, Brasil, Marrocos, México, Egito e Japão, entre outros, totalizou 3.288 milhões de toneladas. Essa grande produção sofreu algumas quedas em alguns destes países e em épocas variadas devido a doenças provocadas por fungos e vírus nas árvores que as destruíam rapidamente. No Brasil, o problema parece ter sido parcialmente resolvido, pois de acordo com o *United States Department of Agriculture* (USDA), a produção de limão entre 1987 e 1988, foi de 35.000 milhões de toneladas.

Marin *et al.* (2002) avaliaram sucos de limão das variedades *Fino* ou *Mesero* e *Verna* (Murcia – Espanha) obtidos por diferentes métodos de extração, observando que a acidez variou de 7,70 a 5,53g/mL; o teor de sólidos solúveis de 9,0 a 6,5g/100mL e de 532 a 261 g/100mL em ácido ascórbico, nos sucos obtidos em processo não industrial (manual), por prensagem e filtração em tela de nylon. A atividade antioxidante total elevada (66%) encontrada no suco de limão da variedade *Fino* (808mg de ácido ascórbico/L) foi considerada um fator importante. A composição de sucos de limão quanto à acidez, sólidos solúveis e ácido ascórbico, presentes em diferentes variedades (cultivares), bem como aquela, em diferentes sistemas de extração, tem sido reportada por alguns autores, porém a composição do suco de lima ácida (*Citrus latifolia*, *Tanaka*), cv. Tahiti, obtido através de cultivo biodinâmico ainda não foi reportada.

Dados reportados pelo USDA (2001) revelaram valores diferenciados quanto aos nutrientes do suco de limão integral sem tratamento térmico, e do limão “in natura” com e sem casca, os quais podem ser observados no Quadro 1.

**Quadro 1. Composição do suco de limão integral, do limão com e sem casca**

	Suco de limão integral	Limão sem casca	Limão com casca
<b>Valor calórico</b>	25Kcal	29Kcal	20Kcal
<b>Carboidratos (g/100g)</b>	9	9	11
<b>Cálcio (mg/100g)</b>	7	26	61
<b>Magnésio(mg/100g)</b>	6	8	12
<b>Fósforo(mg/100g)</b>	6	16	15
<b>Potássio(mg/100g)</b>	124	138	145
<b>Sódio(mg/100g)</b>	1	2	3
<b>Ác. ascórbico(mg/100g)</b>	46	53	77
<b>Folato (µg/100g)</b>	13	11	-
<b>Proteína (g/100g)</b>	-	1	1
<b>Fibra dietética(g/100g)</b>	-	3	5
<b>Ferro(mg/100g)</b>	-	1	1

Fonte: USDA, 2001

Hulme (1971) forneceu valores para açúcares em glicose (1,40g/100mL), frutose (1,35g/100mL) e sacarose (0,41g/100mL), presentes no fruto *in natura* e no suco de limão os valores para açúcares são: glicose: 0,52g/mL; frutose: 0,92g/mL e sacarose: 0,18g/100mL.

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

Outro fator que pode afetar a composição em nutrientes do limão é a utilização de atmosfera modificada no armazenamento da matéria-prima. Jacomino *et al.* (2003) estudaram possíveis variações na acidez titulável e sólidos solúveis em limão “Siciliano”, em atmosferas de armazenamento a 10°C por 21; 28 e 35 dias, com diferentes concentrações de etileno, concluindo que houve alterações nestes parâmetros.

Matérias-primas e alimentos processados de origem animal (carnes, presuntos) ou vegetal como frutas, sucos e néctares, bem como os óleos essenciais obtidos das cascas e folhas de frutas (Tirado *et al.*, 1995) apresentaram em sua composição várias substâncias que conferem características especiais de sabor e aroma (Carvalho *et al.*, 2002 e Carvalho, 2004).

### **Formação de Substâncias Voláteis, Principalmente em Limão/Lima Ácida**

O sabor e o aroma (*flavor*) das matérias-primas de origem vegetal (frutas e hortaliças) são conferidos pelas substâncias voláteis sintetizadas durante sua maturação. Dentre elas, ésteres, álcoois, aldeídos, lactonas, terpenos e compostos sulfurados

desenvolvidos a partir de precursores como proteínas, carboidratos, lipídios e vitaminas (Hulme, 1971 e Vendramini, 1997). As proteínas apresentam-se em baixas concentrações nas frutas e outros vegetais, não sendo seu valor nutritivo considerado, porém seus aminoácidos participam da formação dos pigmentos e substâncias responsáveis pelo sabor e aroma. A valina, por exemplo, pode ser convertida em éster (Eskin, 1990). Os ésteres são da classe de substâncias voláteis mais importantes, tanto quantitativa quanto qualitativamente, no que diz respeito à composição de um aroma (Olias *et al.*, 1995).

Os ácidos graxos insaturados (linolêico e linolênico) estão presentes nas paredes celulares, na forma de triglicerídios, fosfolipídios ou lipoproteínas, além de atuarem na formação de substâncias voláteis responsáveis pelo sabor e aroma. A composição do aroma nas frutas também é derivada do metabolismo lipídico (Vick e Zimmerman, 1976).

As substâncias voláteis responsáveis pelo aroma de frutas e sucos podem sofrer alterações quanto a sua quantidade, intensidade e, até mesmo quanto a sua estrutura, de acordo com a cultivar (variedade), método de cultivo, grau de maturação, embalagem de acondicionamento ou processamento, entre outros aspectos. Portanto, uma avaliação comparativa do perfil das substâncias voláteis responsáveis pelo aroma entre as mesmas variedades cultivadas de formas diversas é, e deve ser considerada importante tanto para produtores quanto para consumidores e ainda para a indústria de sucos, visto que, o sabor e o aroma são os requisitos de extrema relevância nos alimentos. Ainda em relação às substâncias voláteis e a preservação daquelas responsáveis pelo aroma, é preocupação na indústria de alimentos, uma vez que estes devem apresentar aroma e sabor inerentes ao produto, evitando a adição de aditivos artificiais (Carvalho, 2004).

Cada vez mais, busca-se a preservação de alimentos de uma forma geral, a fim de que não ocorram perdas, mesmo que mínimas, de nutrientes e outros constituintes, tais como aqueles responsáveis pelo aroma e sabor (Carvalho, 2004).

De acordo com Lewinsohn *et al.* (2005), há evidências importantes de que as substâncias voláteis são derivadas da degradação de carotenóides, sendo um deles o licopeno, pigmento vermelho presente em variedades de tomates e melancias. Observaram aumento no número destas substâncias incluindo o geranial, monoterpeneo presente no limão. No desenvolvimento das frutas ocorrem sínteses de estruturas



moleculares como proteínas, polissacarídeos, lipídios (0,1%) e flavonóides pelo metabolismo dos carboidratos iniciado pela fotossíntese. Durante o amadurecimento, as reações metabólicas são predominantes e a produção de substâncias voláteis ocorre durante um curto período e é influenciada por fatores internos e externos (Tressl e Albrecht, 1986).

Vanoli *et al.* (1995) avaliaram a influência da época de colheita (158; 172 e 181 dias) sobre as substâncias voláteis em maçãs, cv. *Starkpur Golden*, por CGAR/EM. Embora já tenham sido anteriormente identificadas no fruto, mais de 300 substâncias, apenas 20-40 delas são responsáveis pelo aroma. Os frutos colhidos com 172 dias apresentaram melhor composição quanto às substâncias responsáveis pelo aroma da maçã sendo elas: hexanal, acetatos de butila e hexila; hexanol; etil-2-metil butanoato;  $\beta$ -damascenona; 3-metil-butil e hexil hexanoatos; etil, propil e hexil butanoatos.

A grande variedade de substâncias voláteis encontradas nos frutos em amadurecimento ou maduros, têm sido analisada por cromatografia gasosa de alta resolução associada à espectrometria de massa e sua identificação pela comparação dos índices de retenção obtidos dos cromatogramas (Collins *et al.*, 1995).

Chyau *et al.* (1992) avaliaram o teor de substâncias voláteis em goiabas no amadurecimento e após a maturação encontrando teores de 134 mg/Kg e 93mg/Kg, respectivamente. As principais substâncias voláteis na fruta em amadurecimento foram 1,8-cineol, (E)-2 hexenal e (E)-3-hexenal, enquanto que o hexanoato de etila e o acetato de (Z)-3-hexenila foram as principais na fruta completamente madura. O (E)-2-hexenal e o hexanoato de etila também podem ser encontrados na acerola.

Sheung *et al.* (2004) reportaram a adsorção (migração) de substâncias voláteis de suco de laranja (d-limoneno,  $\alpha$ -pineno, butirato de etila e octanal) envasados em diferentes tipos de laminados co-poliméricos (polietileno de baixa densidade, polietileno tereftalato, cloreto de polivinilideno e álcool vinil etileno) utilizados como embalagem durante a estocagem a 25°C por 28 dias, através da técnica de *headspace* dinâmico e identificação por CGAR. A adsorção do butirato de etila e do octanal foi similar nos quatro tipos de embalagem. Por outro lado, quando utilizaram o polietileno tereftalato (PET) e o álcool vinil etileno em filmes para embalagem, observaram que a adsorção de d-limoneno e de  $\alpha$ -pineno foi de 20 e 50%, respectivamente.

Visai e Vanoli (1997) avaliaram as substâncias voláteis em pêssegos (*Prunus persica*, L. Batsch), cv. *Gloheaven* e nectarinas (*P. persica*, L., Batsch, var. *nucipersica*), cv. Maria Laura, colhidos, semanalmente, até 57 dias após coloração completa da casca. Sampaio e Nogueira (2006) avaliaram o efeito do grau de maturação sobre as substâncias voláteis da mangaba e identificaram, por CGAR/EM, 33 substâncias nos frutos imaturos, 34 no estágio intermediário e 32 nos frutos maduros, dentre elas: o  $\alpha$ -terpineol, o linalool e o geraniol presentes, também, no limão. Soufleros *et al.* (2001) avaliaram as substâncias voláteis de vinhos de Kiwi cultivado na Grécia e dentre as substâncias identificadas, por CGAR/EM, as mais abundantes foram o metanol, metil-2-propano-1-ol, metil-3-butano-1-ol, acetato de etila e o butano-2,3-diol.

Moufida e Marzouk (2003) caracterizaram cultivares de *blood orange*, *sweet orange*, limão, bergamota e *bitter orange*, concluindo que o limão (140.75 $\mu$ g/ml), quando comparado a *sweet orange* (344.46  $\mu$ g/ml) e à bergamota (355.94 $\mu$ g/ml), apresenta menor quantidade de substâncias voláteis responsáveis pelo aroma. Em todas as cultivares, foram encontradas as seguintes substâncias voláteis:  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -pineno e p-cimeno. O limoneno (111,07 $\mu$ g/L) destacou-se a mais abundante sendo de fundamental importância no aroma de sucos cítricos. Seu percentual variou de 50% no limão a 93% na *bitter orange*, e 97% no *grapefruit* (Dugo *et al.*, 1993 e Tonder *et al.*, 1998). Tanto os monoterpenos (85,308mg/L) como as outras substâncias encontradas podem ser observadas no Quadro 2.

A Tunísia é conhecida como a maior produtora de frutas cítricas, cerca de 240.000 toneladas em 2000/2001 e a qualidade sensorial é determinada pelos seguintes parâmetros: substâncias voláteis, quantidade de suco e açúcares, além da acidez que pode ser elevada nos limões e nas limas, mas moderada em outras frutas (Moufida e Marzouk, 2003). Similarmente, Swingle (1943) relatou que o limão (*Citrus limon*, L.) tem a polpa ácida, uma fina textura, além da coloração amarelo-pálido.

O Brasil é conhecido pela produção substancial de cítricos, principalmente a laranja e o limão obtidos por cultivo convencional. A exportação brasileira de limão em 2005 (até agosto) foi de 34.427,755 toneladas, de acordo com a Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Limão - ABPEL ([www.abpel.org.br/news1.htm](http://www.abpel.org.br/news1.htm)). Já a produção orgânica nacional é destinada ao abastecimento do mercado interno, mas com perspectivas promissoras visando o mercado internacional.

**Quadro 2. Substâncias voláteis em limão cultivado na Tunísia**

Substância	mg/L	%
Metanol	0,28	0,20
Isopropanol	0,17	0,12
$\alpha$ -pineno	0,39	0,27
Acetato de butila	3000	1,47
3-heptanona	0,46	0,34
Limoneno	111,07	78,83
Ocimeno	5,31	3,85
Nonanol	0,39	0,25
Linalool	0,01	0,01
$\alpha$ -terpineol	1,80	1,30
Valenceno	4,80	3,34
$\alpha$ -terpineno	0,34	0,46
$\beta$ -ionona	1,32	0,34
$\beta$ -pineno	0,21	0,02
Terpineno-4-ol	-	-
p-cimeno	2,00	1,74
Hidrocarbonetos monoterpênicos	85,31	-

Moufida, S. & Marzouk, B., 2003.

Várias substâncias têm sido identificadas no limão, como: metanol, isopropanol, linalool,  $\alpha$ -terpineol, acetato de butila, 3-heptanona, ocimeno, nonanol, valenceno,  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -ionona, terpinen-4-ol, p-cimeno, também identificadas em sucos cítricos. Moufida e Marzouk (2003) identificaram as mesmas substâncias, entre outras, no suco de limão. Algumas foram encontradas como substâncias traço, outras em percentuais semelhantes aos outros sucos analisados e algumas em quantidade suficiente para que fossem identificadas e quantificadas.

Narain e Bora (1992) avaliaram a perda de substâncias voláteis em maracujá (*Passiflora edulis*, L.) após estocagem por 15 dias, à temperatura ambiente (29°C) identificando, por CGAR/EM, aquelas mais abundantes após este período, dentre elas encontraram butanoatos de etila e hexila, hexanoato de etila, 2-heptanona, benzaldeído e 1-hexanol.

Nos métodos validados de extração de substâncias voláteis empregados pelos vários autores mencionados na presente dissertação, as substâncias voláteis podem ser perdidas devido à manipulação excessiva da amostra possibilitando a formação de artefatos ou sendo contaminadas pelos solventes.

Sucos de frutas são bem definidos pelo Conselho Diretivo 2001/112/EC, que caracteriza como 100% puro, aquele sem conservantes. Já os produtos orgânicos podem ser definidos como produtos de um sistema de cultivo que utiliza fertilizantes,

reguladores de crescimento e aditivos não-químicos produzidos pelo agricultor (*Council Regulation EEC n° 2092/91*).

O crescente interesse na identificação de substâncias voláteis em frutas tropicais tem sido pesquisado. Pino (1997) identificou estas substâncias nos frutos do kiwi, na carambola e na manga. Apesar do aumento em pesquisas envolvendo a identificação de substâncias voláteis em frutas e sucos de frutas, poucos trabalhos têm sido publicados em relação a sua enorme biodiversidade.

Durante o processo de concentração de sucos, muitas substâncias voláteis são removidas e perdidas. Nos sucos cítricos ocorre a presença várias substâncias voláteis, sendo divididas em 2 grupos: solúveis em água e solúveis em óleo, onde aquelas solúveis em água referem-se ao aroma, enquanto que a fração solúvel em óleo é representada pelos óleos essenciais.

Um óleo essencial pode também ser definido como a substância volátil obtida a partir do vapor destilado de plantas ou de material derivado. Frutas cítricas, como a laranja, o limão, a lima e a tangerina, têm alta concentração de óleos essenciais em sua casca. O limoneno é, também, a principal substância volátil dos óleos essenciais de *Citrus* (Hendrix e Redd,1990).

### **Métodos de Extração e Adsorção**

O crescente interesse na identificação de substâncias voláteis em frutas e produtos delas derivados, com técnicas de extração como: líquido-líquido (ELL), destilação (DE), destilação a vapor seguida de extração com solventes, extração/destilação simultâneas (EDS), extração/destilação líquido-líquido (EDLL), destilação com *headspace* (DHE) estático e dinâmico, entre outras técnicas associadas CGAR/EM, têm sido utilizadas por vários autores, ao longo dos anos (Macku & Shibamoto,1991; Raupp & Konig,1996; Carvalho, 2004).

Os vários métodos validados de extração de substâncias voláteis de uma matéria-prima ou um alimento, normalmente envolvem uma série de etapas que levam a um tempo de análise excessivamente longo.

A técnica de microextração em fase sólida (MEFS) é um método de extração alternativo, eficiente, pratico, atual e de baixo custo. Sua aplicação o torna uma análise rápida, simples e de rotina em laboratório. Baseia-se na adsorção de substâncias voláteis em microfibras poliméricas que, em contato direto com o alimento ou por *headspace*,

são desorvidas aplicando-se a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massa (CGAR-EM), que tem se mostrado eficiente na identificação dessas substâncias (Arthur & Pawliszyn, 1990; Carvalho, 2004).

Pino (1997) utilizou a EDS seguida de CGAR/EM, para identificar as substâncias voláteis da carambola, manga e kiwi. A análise dos componentes voláteis é a principal tarefa para entender a natureza dos aromas naturais ou de alimentos processados. Entre muitas técnicas desenvolvidas para analisar os aromas, a análise com *headspace* é uma técnica apropriada e tem sido bem utilizada para o estudo de aromas naturais.

Concluindo que o método de isolamento e concentração de substâncias voláteis da fase gasosa (*headspace*) elimina muitas desvantagens quando comparada a outros métodos, como por exemplo, onde há manipulação excessiva da amostra possibilitando a formação de artefatos, contaminação pelo solvente utilizado, purificação ineficiente, entre outros fatores.

### **Microextração em Fase Sólida na Adsorção de Voláteis em Matérias-Primas e Produtos de Origem Vegetal**

A técnica de microextração em fase sólida (MEFS) é um método de extração alternativo aos convencionais que torna a análise dessas substâncias rápida e simples. Baseia-se na adsorção dessas substâncias em microfibras poliméricas que, em contato direto com o alimento ou por *headspace* são, a seguir, analisadas e identificadas por CGAR/EM, mostrando-se eficiente (Carvalho, 2004).

Belardi e Pawliszyn (1989) a reportaram, pela 1ª vez analisando compostos ambientais em águas (efluentes). Apresenta como vantagens, a não utilização de solventes, a pré-concentração da amostra, independe do tipo e da forma física do alimento, podendo ser realizada à temperatura ambiente e, desta forma, minimizar ou mesmo impedir a formação de artefatos químicos. É uma técnica de equilíbrio e quantificação acurada e requer que as extrações sejam cuidadosamente controladas quanto ao tempo de contato, entre a amostra e a microfibra.

Carvalho *et al.* (2000) e Carvalho *et al.* (2002) utilizaram a MEFS com imersão da microfibra e, posterior identificação por CGAR/EM, em sucos de abacaxi integrais, hidrolisados e clarificados por ultrafiltração (UF) e microfiltração (MF), observando

maior teor de voláteis no suco integral não pasteurizado enquanto que nos sucos clarificados nos sistemas utilizados a perda de voláteis foi expressiva para todos os tipos de membrana.. Foram identificadas 31 substâncias voláteis, dentre elas: ésteres, aldeídos, álcoois e cetonas, comprovando a eficiência da técnica na extração destas substâncias.

A MEFS baseia-se na partição dos compostos orgânicos entre a solução aquosa (matrizes líquidas) ou a fase de vapor (matrizes sólidas) através da adsorção em filmes poliméricos, normalmente, de polidimetilsiloxano (PDMS) ou poliacrilato (PA) revestindo fibras de sílica fundida. Atualmente, várias microfibras são encontradas e as mais utilizadas são PMDS, PA, carboxen/PDMS (CAR/PDMS), PDMS/divinilbenzeno (PDMS/DVB).

Os parâmetros que podem afetar a eficiência da extração são: o tempo de contato ou o tempo de equilíbrio, no caso de extração direta (por imersão) a homogeneidade da mistura realizada por agitação da amostra, que promove equilíbrio mais rápido, a manutenção do pH com a adição na amostra de solução tampão e a concentração de sal (Pawliszyn, 1997), que podem melhorar a extração. O tempo de contato inadequado fará com que as substâncias voláteis não sejam adsorvidas pela microfibra. A temperatura pode promover a dissociação das substâncias a serem extraídas e conduzir à formação de artefatos.

Estudos revelam que a forma de acondicionamento de sucos de frutas pode também interferir na quantidade de substâncias voláteis. Por outro lado, pode haver migração de substâncias da embalagem para os sucos como, por exemplo, os ftalatos (isobutilftalato) (Carvalho *et al.*, 2002).

A combinação da cromatografia gasosa de alta resolução com a espectrometria de massa (CGAR-EM) permite identificar as substâncias voláteis, individualmente, na matriz que estiver sendo utilizada.

As substâncias voláteis responsáveis pelo aroma de frutas e sucos de frutas podem sofrer diferenciação quanto à sua quantidade e intensidade, de acordo com a cultivar (variedade), método de cultivo, grau de maturação, embalagem, entre outros aspectos (Carvalho, 2004).

Portanto, torna-se necessária uma avaliação comparativa do perfil de aromas entre variedades idênticas cultivadas de formas diversas devendo ser realizada a fim de que, sejam determinadas possíveis diferenças entre os frutos obtidos.

## **JUSTIFICATIVA**

O aroma dos alimentos é de grande importância visto caracterizar um determinado alimento ou matéria-prima, bem como a sua qualidade.

O limão ou lima ácida, cv. Tahiti, é um fruto muito popular, destacando-se pela sua grande utilização tanto na forma de suco quanto para outros fins, como o medicinal.

Com a introdução de novas técnicas de cultivo que visam menor agressão ao meio-ambiente, matérias-primas alternativas como aquelas de origem orgânica biodinâmica, de mesma variedade, têm sido colocadas no mercado para o consumidor, sendo comparáveis as de cultivo convencional. Portanto, a comparação dos perfis de substâncias voláteis presentes na lima ácida convencional e na orgânica biodinâmica torna-se relevante.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Identificar e comparar as substâncias voláteis presentes em sucos de lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, obtidos por cultivos convencional e biodinâmico (certificado).

### **Objetivos Específicos**

- Utilizar a técnica da microextração em fase sólida (MEFS) na adsorção das substâncias voláteis nos sucos de lima ácida (convencional e biodinâmico);
- Selecionar entre cinco microfibras utilizadas, a de melhor eficiência para a adsorção de substâncias voláteis;
- Analisar as substâncias voláteis nos sucos de lima ácida, cv. Tahiti, obtidos de frutos provenientes de cultivos biodinâmico e convencional.
- Identificar e quantificar as substâncias voláteis nos sucos de lima ácida, (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, obtidos de matéria-prima proveniente de cultivos biodinâmico e convencional.
- Analisar, avaliar e comparar qualitativamente as substâncias voláteis nos sucos de lima ácida (*Citrus latifolia*, Tanaka), cv. Tahiti, obtidos por cultivos biodinâmico e convencional, a fim de observar possíveis diferenças no perfil aromático.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Preparo do Solo para Cultivo da Lima Ácida Biodinâmica**

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

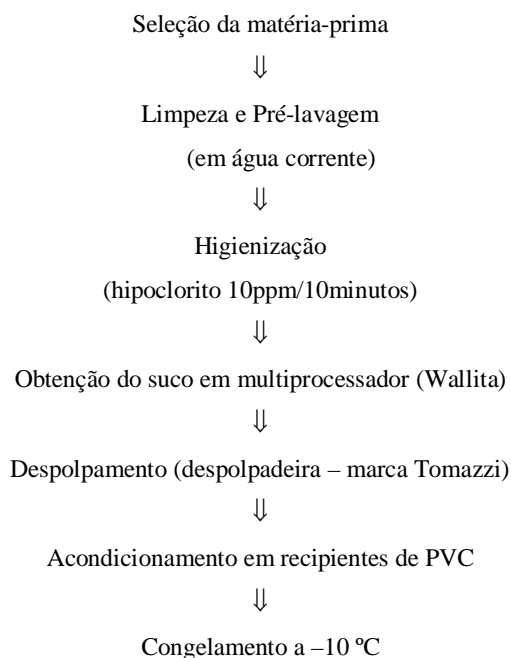
### **Matérias-Primas**

Foram utilizados para a obtenção do suco, 18 Kg de lima ácida cultivada na Fazenda Bom Jesus – SP, safra junho/2005, por plantio biodinâmico (certificado) e 20Kg de lima ácida obtida por plantio convencional, adquirido no Mercado de Benfica/RJ, safra maio/junho, 2005. Os limões foram separados em 2 grupos: LC (limão convencional) e LB (limão biodinâmico), em 5 lotes com 10 unidades experimentais por lote.

### **Obtenção do Suco de Lima Ácida**

A extração do suco foi realizada no laboratório do Instituto de Nutrição Josué de Castro/UFRJ. O suco foi obtido através do Fluxograma 1.

### **Fluxograma 1. Obtenção do suco de lima ácida**



Foram retiradas e armazenadas amostras de 50 mL de cada um dos 10 lotes (5 de biodinâmico + 5 de convencional como controle) em frascos de vidro mantidos sob congelamento a -10<sup>0</sup>C para posterior otimização das microfibras e análises das substâncias voláteis por MEFS/CGAR/EM.

### **Delineamento Experimental**

A partir de 18 Kg de lima ácida biodinâmica foram separados 5 lotes com 10 frutos, sem injúrias e com maturidade comercial, para cada lote. O suco de cada um dos cinco lotes foi extraído, mecanicamente, e armazenado em frascos com 50 mL e mantidos sob congelamento a -10°C. O mesmo procedimento foi realizado para a lima ácida proveniente de cultivo convencional, mas partindo-se de 20 Kg da matéria-prima. Os sucos obtidos foram devidamente codificados como: LC (lima ácida convencional) e LB (lima ácida biodinâmica), e as amostras retiradas randomicamente, obtendo-se a seguir os sucos provenientes de cada tipo de cultivo para as análises das substâncias voláteis.

## Rendimento

Os cálculos de rendimento do suco e da quantidade de cascas, da lima ácida tanto convencional como biodinâmica, foram realizados por regra de três, a partir do peso bruto do lote equivalente a 100% de rendimento, realizado para cada um dos cinco lotes e, ao final, foi calculada a média aritmética, ou seja, o somatório dos lotes dividido por cinco. A densidade do suco foi calculada através do peso do suco (por lote) dividido pelo volume. A análise estatística foi realizada no programa *Statistic 6.0*, analisando a variância (ANOVA) e a comparação entre as médias dos tratamentos através do teste *Least Significance Difference* (LSD) ao nível de 5% de probabilidade.

## Metodologia Analítica

### Seleção da Microfibra de Melhor Eficiência (Otimização)

#### 1ª ETAPA:

Com a finalidade de otimizar e selecionar a microfibra de melhor eficiência quanto à adsorção das substâncias voláteis, foi retirada uma amostra aleatória do suco de um dos cinco lotes de cada tipo de cultivo, os quais foram descongelados a temperatura ambiente.

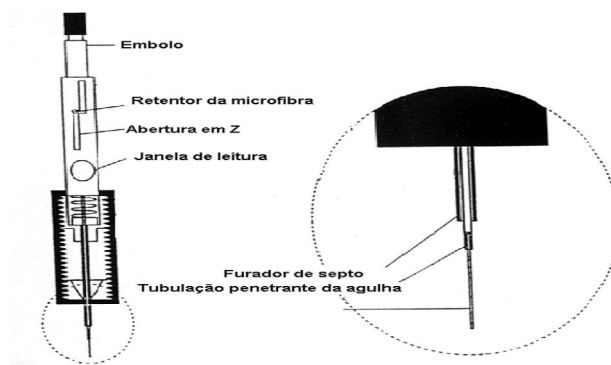
As análises foram realizadas no Laboratório de Óleos Essenciais da Embrapa – Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro. Na microextração em fase sólida (MEFS), foi utilizado 1g da amostra (temperatura ambiente) para análise em cada uma das microfibras (Supelco, Bellefonte, PA, USA) descritas na Tabela 1.

**Tabela 1. Microfibras utilizadas na 1ª etapa das análises**

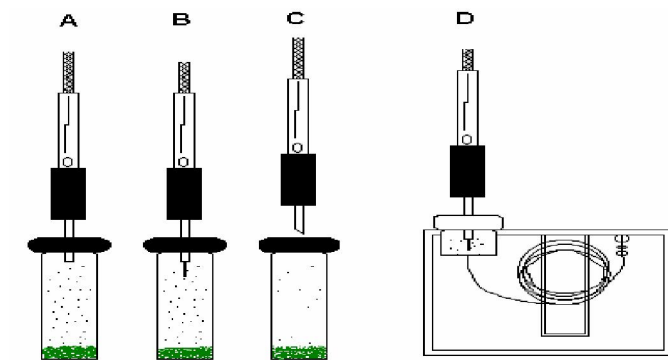
Microfibra	Sigla	Tamanho
Polidimetilsiloxano	PDMS	100µm
Poliacrilato	PA	85µm
Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno	PDMS/DVB	65µm
Carboxen/Polidimetilsiloxano	CAR/PDMS	75µm
Carbowax/Divinilbenzeno	CW/DVB	70µm

Para a seleção da microfibra de melhor eficiência, foi pesado, 1 g de suco em frasco de 4 mL, lacrado com septo de borracha, mantido por 30 minutos sob agitação

mecânica, em placa magnética (Corning TC351), utilizando agitador magnético (Sigma Aldrich - Z283784-3EA- 8x 1,5mm), a temperatura ambiente, para estabilização da amostra. Em seguida, a agulha da micro-seringa foi inserida no septo e a microfibras exposta à atmosfera do interior do frasco por 15 minutos, no *headspace*, sob agitação, para a adsorção das substâncias voláteis presentes na amostra. Após este tempo, a microfibras foi recolhida e a micro-seringa retirada do frasco e introduzida no cromatógrafo a gás (CGAR/EM), marca Agilent 6890N (Hewlett-Packard, Wilmington, DE, USA), equipado com coluna capilar HP5MS (metilsiloxano - 25m x 0,32mm x 0,25 $\mu$ m), nas seguintes condições: fluxo do gás de arraste ( $H_2$ ) - 1,0mL/min (40 $^{\circ}$ C); temperatura inicial de 40 $^{\circ}$ C; tempo inicial de 3 min; temperatura final de 220 $^{\circ}$ C; tempo total de análise de 60 min; taxa de aquecimento de 3 $^{\circ}$ C/min. O injetor foi operado no modo sem divisão de fluxo (*splitless*) a 250 $^{\circ}$ C; o detector de ionização por chama (FID) foi mantido a 300 $^{\circ}$ C e a espectrometria de massas foi realizada em detector seletivo de massas 5973N, utilizando coluna capilar HP5MS (metilsiloxano - 25m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m) e Hélio como gás de arraste (1,0mL/min). As condições cromatográficas foram as mesmas acima descritas. Para a espectrometria de massas, foi utilizada a técnica de impacto de elétrons, com a fonte de íons operando a 230 $^{\circ}$ C e energia de ionização de 70eV. A microfibras contendo as substâncias voláteis extraídas foi inserida no injetor e a fibra exposta por 3 minutos para dessorção. O procedimento foi realizado em triplicata, nas mesmas condições, para cada uma das microfibras.



**Esquema 1. Microextração em Fase Sólida (MEFS)**



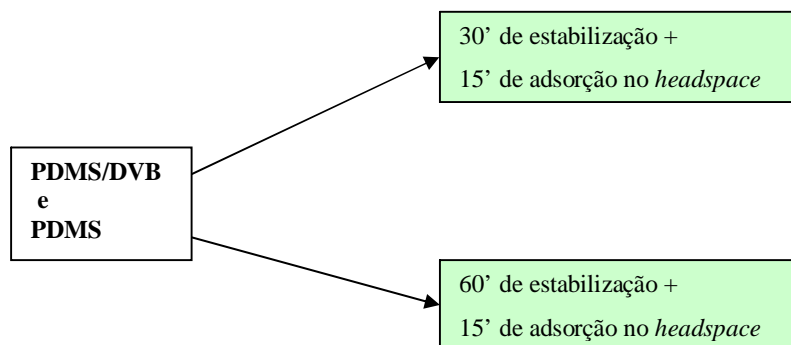
**Esquema 2. MEFS para a adsorção das substâncias voláteis**

O parâmetro de seleção empregado foi o perfil cromatográfico quanto a intensidade dos picos e sua quantidade. A identificação das substâncias voláteis nas amostras foi realizada através da comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles da espectroteca Wiley *6th edition*, e por comparação dos índices de retenção calculados com os valores da literatura (Adams, 1995). Os índices de retenção foram calculados a partir dos tempos de retenção das substâncias nas amostras e dos tempos de retenção de uma série de n-alcenos ( $C_8$ - $C_{24}$ ), injetados na mesma coluna e condições experimentais descritas acima.

### **2ª ETAPA:**

A partir das microfibras de melhor eficiência (PDMS/DVB e PDMS) na adsorção das substâncias voláteis na primeira etapa, a metodologia foi repetida para que fosse selecionada aquela mais eficiente na adsorção dos voláteis, porém com a adição de NaCl (0,2g) às amostras, além da observação da influência do tempo de estabilização na adsorção dessas substâncias, utilizando os tempos de estabilização de 30 e 60 minutos. A seleção e a identificação foram realizadas nas mesmas condições descritas acima.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, seguindo-se a metodologia descrita, anteriormente (Esquema 3). Após a seleção da melhor microfibra, as análises dos sucos de lima ácida foram realizadas de acordo com a metodologia descrita, anteriormente.



**Esquema 3. Parâmetros para a seleção entre as microfibras de PDMS/DVB e PDMS**

### **Quantificação das Substâncias Voláteis Identificadas**

A quantificação das substâncias voláteis constituiu-se na pesagem de 7g de amostra, em triplicata, em béqueres de 50mL, transferindo-se para funil de separação de 125mL, procedendo-se então, a extração, com mistura de n-pentano e éter etílico (1:1). A fase orgânica, foi separada e filtrada em funil contendo sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

O solvente da amostra foi evaporado, em evaporador rotativo (Buchi, modelo 461), a temperatura ambiente, até volume final de, aproximadamente, 1 mL, o qual foi transferido para frasco de 2 mL e armazenado a  $-10^\circ\text{C}$  para posterior análise.

O padrão interno utilizado na quantificação foi de octanoato de etila. Pesou-se 54mg de octanoato de etila em balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com éter etílico. A seguir, adicionou-se 1,0 mL desta solução a 1,0 mL da amostra e injetou-se no cromatógrafo. A massa de padrão interno injetada foi de 1,08ng.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Rendimento dos Sucos

Os rendimentos de suco de lima ácida cultivada pelo método convencional (LC) e da lima ácida biodinâmica (LB) foram de 56,02% ( $\pm 1,219$ ) e 44,2% ( $\pm 3,434$ ), respectivamente. O suco convencional obteve maior rendimento do que aquele orgânico biodinâmico, sendo por este aspecto, a matéria-prima convencional mais interessante para a indústria de alimentos.

No Quadro 3, observa-se que o rendimento de suco da amostra LC apresentou-se significativamente maior do que o da amostra LB ( $p < 0,001$ ), o que pode ser devido ao percentual de casca mais elevado nos frutos biodinâmicos, fornecendo um volume menor de suco em relação ao peso total do fruto.

**Quadro 3. Rendimento dos sucos de lima ácida convencional e biodinâmica**

Amostras	Rendimento (%)	Cascas (%)
LC	56,02 <sup>a</sup> ( $\pm 1,22$ )	40,63 ( $\pm 2,31$ )
LB	44,2 <sup>b</sup> ( $\pm 3,43$ )	49,16 ( $\pm 2,70$ )

O percentual de suco pode ser reduzido em cultivos com concentrações altas de nitrogênio e potássio acarretando aumento na espessura da casca. A umidade relativa e a temperatura do ambiente também podem influenciar na espessura da casca de frutos cítricos (Chitarra & Chitarra, 1990).

### Seleção da Microfibra de Melhor Eficiência

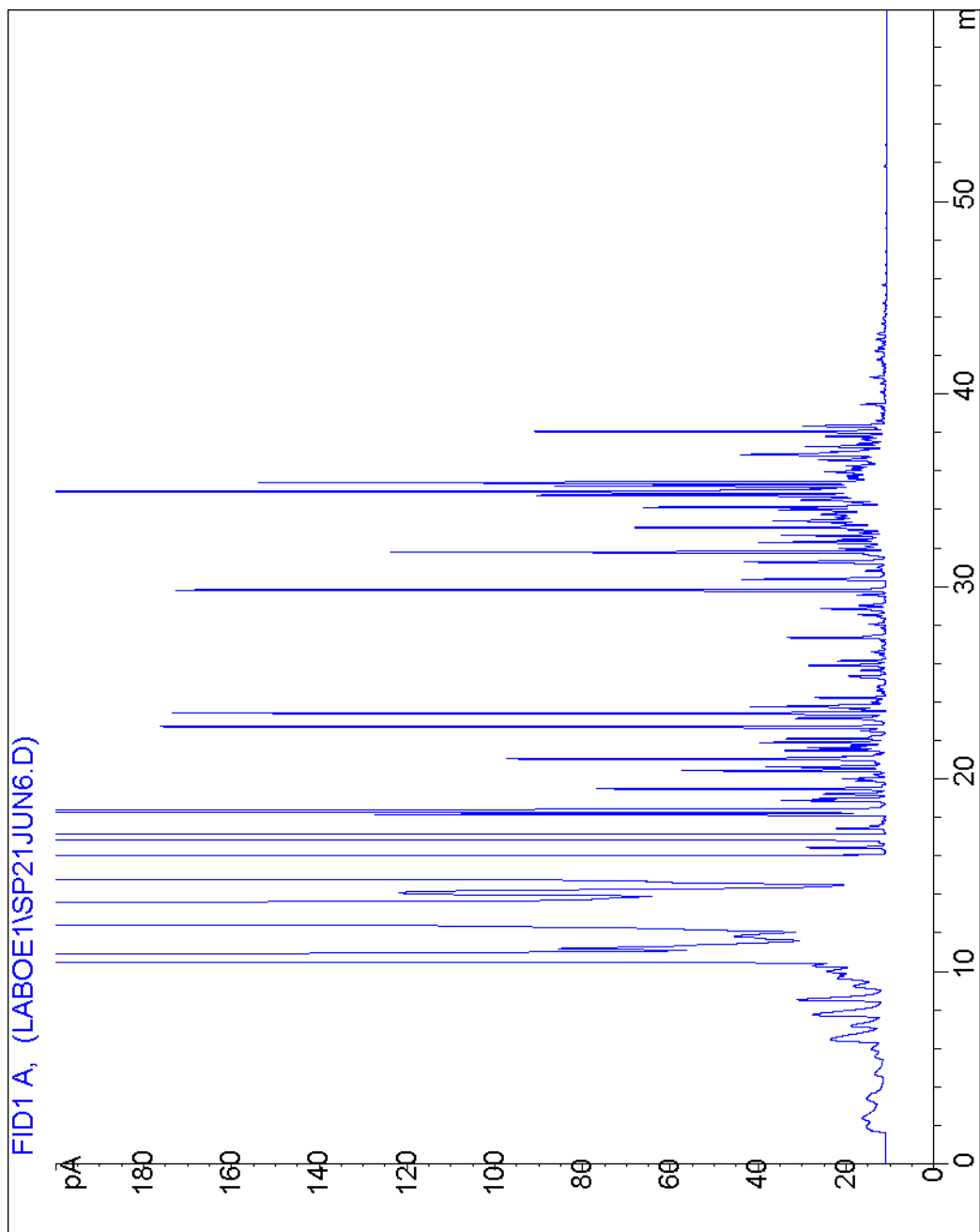
Na primeira etapa deste trabalho, foram comparados cinco tipos de microfibras de diferentes revestimentos. As substâncias voláteis de sucos e polpas de frutas têm sido analisadas através do método de MEFS, acoplada a cromatografia gasosa, como a laranja (Steffen e Pawliszyn, 1996), cupuassu, cajá, siriguela e graviola (Augusto *et al.*, 2000).

A MEFS realizada com as microfibras de PDMS/DVB e PDMS para a extração das substâncias voláteis dos sucos de lima ácida, com tempo de estabilização da amostra 30 minutos, 15 minutos de adsorção e 3 minutos de dessorção, sem adição de NaCl,



apresentou maior quantidade de picos das substâncias voláteis adsorvidas, sendo eles 59 e 44, respectivamente (Figuras 1 e 2).

As condições de análise por MEFS foram determinadas de forma experimental, pelo tempo de adsorção e dessorção. O melhor tempo de adsorção foi de 15 minutos com 30 minutos de estabilização da amostra, tempo suficiente para garantir que todas as substâncias voláteis fossem removidas da fibra. Quanto às condições de análise, a temperatura não permitiu que as amostras sofressem degradação térmica, pois todo o experimento foi realizado a temperatura ambiente. A agitação magnética fez com que aumentasse a velocidade da partição das substâncias voláteis do *headspace* da amostra para a microfibras. A comparação foi realizada entre as amostras de suco de lima ácida de cultivos convencional e biodinâmico, sendo realizada a identificação das substâncias voláteis nas amostras. De acordo com Augusto *et al.* (2000) a seleção da microfibras de melhor *performance* pode ser realizada através da eficiência da extração e através do número de substâncias identificadas na extração.



**Figura 1. Substâncias voláteis de suco de lima ácida (biodinâmico) extraídas por MEFS, em 30 minutos, sem adição de sal, em microfibra de PDMS/DVB**

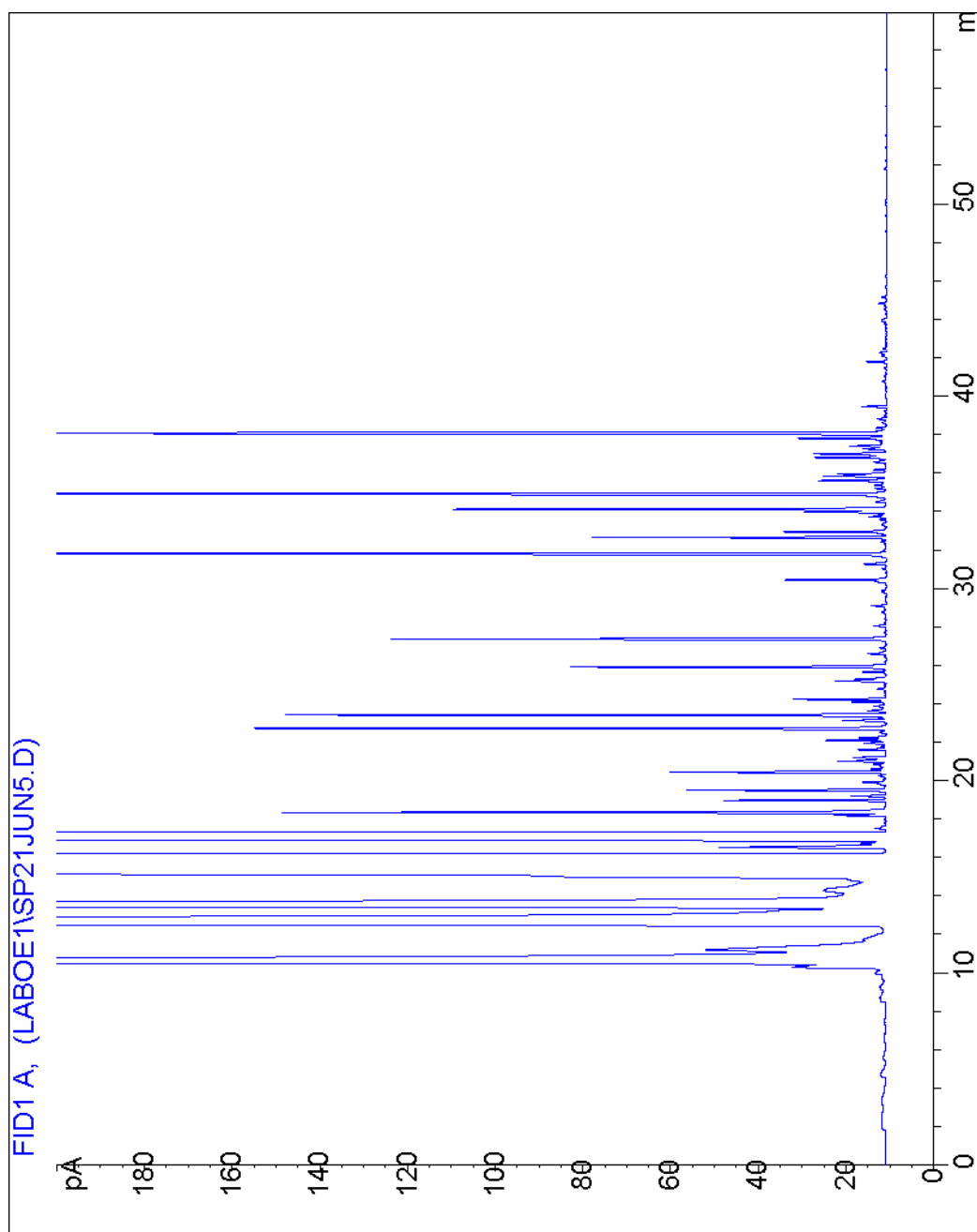


Figura 2. Substâncias voláteis de suco de lima ácida (biodinâmico) extraídas por MEFS, em 30 minutos, sem adição de sal, em microfibra de PDMS

Augusto *et al.* (2000) pesquisaram as substâncias voláteis de cupuassu, cajá, siriguela e graviola, frutas características do Brasil, utilizando a MEFS/CGAR/EM, com as microfibras de polidimetilsiloxano (PDMS) 100µm, poliacrilato (PA) 85µm, carbowax/ divinilbenzeno (CW/DVB) 65µm e carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) 75µm, identificando 37, 34, 27 e 21 substâncias voláteis, respectivamente.

Prudente *et al.* (2003) avaliaram as substâncias voláteis do calamondin, fruto cítrico consumido nas Filipinas, substituto da lima e do limão, durante a maturação, utilizando a MEFS/*headspace* com microfibra de polidimetilsiloxano (PDMS) seguida por CGAR/EM, identificando 30 substâncias no suco e no óleo essencial.

Riu-Aumatell *et al.* (2004) analisaram as substâncias voláteis de sucos de pêra, damasco e pêssego, por MEFS com *headspace*, utilizando microfibra de polidimetilsiloxano (PDMS), a 40<sup>o</sup>C por 30 minutos sob agitação, seguida por CGAR/EM, e concluíram que a aplicação da MEFS foi satisfatória na análise do perfil de aromas dos sucos analisados.

Carvalho (2004), analisando as substâncias voláteis nos sucos de abacaxi integral pasteurizado e hidrolizado, utilizou a MEFS com imersão da microfibra de PDMS (100µm) e identificou por CG/MS, 32 no suco pasteurizado e 35 no hidrolizado.

Guillot *et al.* (2006) analisaram 6 cultivares de damasco, utilizando a MEFS/*headspace*, com microfibras de PDMS (100µm), PDMS/DVB (65µm) e CAR/PDMS (75µm). O tempo de estabilização foi de 40 minutos a 40°C, tempo de adsorção de 20 minutos, à mesma temperatura e a dessorção em CGAR a 250°C/4 min. Concluíram que as microfibras adsorveram 23 substâncias voláteis comuns entre as variedades analisadas.

### **Verificação da Melhoria da Extração com Adição de Sal**

Após verificar-se que as microfibras de PDMS/DVB e PDMS apresentavam maior número de substâncias adsorvidas, 59 e 44 substâncias respectivamente, além de cromatogramas mais definidos, optou-se pela escolha das microfibras de PDMS/DVB e de PDMS para a otimização da extração com adição de sal às amostras.

Observou-se aumento no número de substâncias voláteis em ambas as microfibras no tempo de 30 minutos de estabilização com a adição de sal, onde a de PDMS/DVB adsorveu 75 substâncias voláteis e a de PDMS 52 substâncias. Porém, quando foram utilizadas as mesmas microfibras no tempo de 60 minutos de estabilização com adição de sal, a microfibra de PDMS adsorveu um menor número de substâncias voláteis quando comparada às amostras com e sem sal, no tempo de 30 minutos de estabilização.

Portanto, após 60 minutos de estabilização a microfibra de PDMS/DVB adsorveu 72 substâncias voláteis enquanto que a de PDMS adsorveu 41. Neste estudo esperava-se que o aumento do tempo de estabilização associado a adição de sal implicasse em uma maior adsorção de substâncias voláteis porém não foi observada, provavelmente devido ao grau de saturação da microfibra utilizada. Optou-se, então, pela microfibra de PDMS/DVB por ter sido a que preservou maior número das substâncias adsorvidas.

A adição de sal foi importante na liberação das substâncias voláteis para o *headspace* das amostras, devido a sua capacidade em absorver água, saturar o meio e liberar as substâncias voláteis nele presentes. Pawliszyn (1997), já havia mencionado que o efeito da adição de sal é ampliado com o acréscimo da polaridade da substância. De acordo com Oliveira (2006/2), o efeito da adição de sal na MEFS depende do componente, da concentração de sal e do tipo da fibra, podendo-se observar que esta adição aumenta ou diminui a quantidade de substâncias voláteis extraídas e que a sensibilidade da MEFS muda significativamente com o aumento da força iônica, que amplia sua eficiência.

Para a 2ª etapa, foi adicionado 0,2g de NaCl às amostras, porém alterou-se o tempo de estabilização da amostra (30 e 60 minutos), com 15 minutos de adsorção e 3 minutos de dessorção. A adição de sal realmente aumentou a eficiência da extração, já que a sensibilidade da MEFS muda com o aumento da força iônica, permitindo que grande quantidade de substâncias voláteis atingisse com maior velocidade ou facilidade o *headspace* da amostra para melhor adsorção. A diferença entre os tempos de estabilização demonstrou que 30 minutos foram suficientes para o objetivo da presente dissertação e que o tempo de estabilização não influenciou na adsorção e sim a adição

de NaCl. A condição escolhida, foi portanto de 30 minutos de estabilização, 15 minutos de adsorção, 3 minutos de dessorção para 1g de suco com adição de 0,2g de NaCl.

A quantidade de 0,2g NaCl utilizada, ou seja, 20%, foi escolhida por ser uma padronização do laboratório onde as análises foram realizadas, sendo este credenciado pelo In Metro para a ISO 17025.

### **Extração das Substâncias Voláteis com as Microfibras de PDMS/DVB e PDMS**

Ainda na segunda etapa, foram avaliadas as microfibras de PDMS (100 $\mu$ m) e de PDMS/DVB (65 $\mu$ m). Tendo cada revestimento suas vantagens, como por exemplo, a PDMS que é um revestimento apolar, eficiente para substâncias polares e apolares (Oliveira, 2006/2). Neste estudo, portanto, foi escolhida a fibra de melhor eficiência para a adsorção das substâncias voláteis em ambos os sucos. Ainda de acordo com Oliveira (2006/2), a fibra apolar extrai uma quantidade superior de analitos, o que demonstra que a partição dos analitos geralmente é favorecida pelo revestimento PDMS para praticamente todos os analitos, escolhendo em seu trabalho a fibra de 100 $\mu$ m PDMS, já para este trabalho houve duas microfibras de excelente adsorção e ambas com PDMS (PDMS/DVB e PDMS) no seu revestimento, porém o fator que fez a diferença para a melhor adsorção das substâncias voláteis foi a adição de sal, sendo então escolhida a fibra de 65 $\mu$ m PDMS/DVB.

A microfibra de PDMS/DVB adsorveu um maior número de substâncias voláteis em 30 minutos de estabilização, tendo sido utilizada para realização das análises em todas as amostras de lima ácida (5 de controle + 5 de biodinâmico), em triplicata, acrescidas de NaCl (0,2g), no tempo de estabilização de 30 minutos acrescido de 15 minutos de adsorção e 3 minutos de dessorção, nas mesmas condições anteriormente citadas.

A microfibra de PDMS/DVB adsorveu 75 substâncias voláteis em 30 minutos e 72 em 60 minutos de estabilização, enquanto que, a microfibra de PDMS adsorveu 52 e 41 substâncias voláteis, em 30 e 60 minutos, respectivamente (Quadro 4).

**Quadro 4 - Substâncias adsorvidas do suco de lima ácida na MEFS com PDMS/DVB e PDMS**

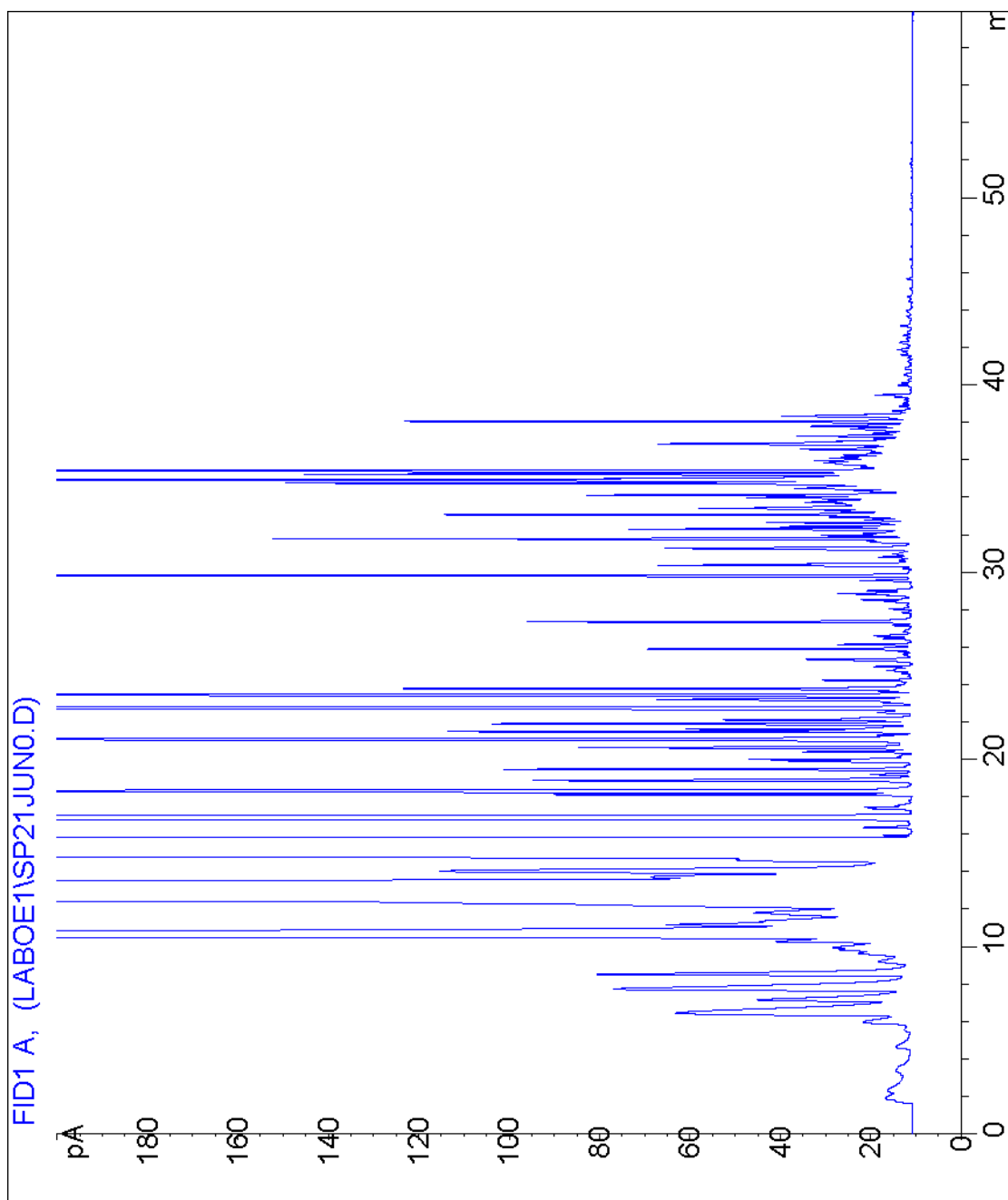
Microfibra	30 minutos (sem adição de NaCl)	30 minutos (com adição de NaCl)	60 minutos (com adição de NaCl)
<b>PDMS/DVB</b>	59	75	72
<b>PDMS</b>	44	52	41

Nas Figuras 3 e 4 são apresentados os cromatogramas das substâncias voláteis extraídas das amostras de suco de lima ácida com a microfibra de PDMS/DVB com adição de sal, nos tempos de 30 e 60 minutos de estabilização.

De acordo com Pawliszyn (1997), muitas substâncias voláteis são acumuladas no *headspace*, e permanecem menos na fase líquida e na fibra, resultando na perda de sensibilidade, quando o tamanho deste espaço é grande.

Kim *et al.* (2003) utilizaram as microfibras de PDMS (100µm), CAR/PDMS (75 µm), PDMS/DVB (65µm) e DVB/CAR/PDMS (50/30µm) na MEFS de chá de yuzu (*Citrus junos*), sem a adição de NaCl, concluindo que a microfibra de PDMS foi a mais efetiva na extração das substâncias voláteis e que o limoneno foi a substância mais abundante. Os resultados obtidos contrariam aqueles encontrados na presente dissertação quando a microfibra de PDMS/DVB (65µm) foi a que apresentou melhor adsorção das substâncias voláteis nas amostras de suco de lima ácida com e sem a adição de sal.

De forma geral, as substâncias voláteis têm papel predominante por conferirem um caráter particular a cada fruta, porém sua quantidade maior ou menor não implica no seu impacto sensorial, uma vez que, os constituintes mais abundantes não, necessariamente, são as substâncias voláteis que promovem impacto sensorial (Pino, 1998).



**Figura 3. Cromatograma das substâncias voláteis da amostra de suco de lima ácida (biodinâmico) extraídos por MEFS, em 30 minutos, com adição de sal, em microfibra de PDMS/DVB**



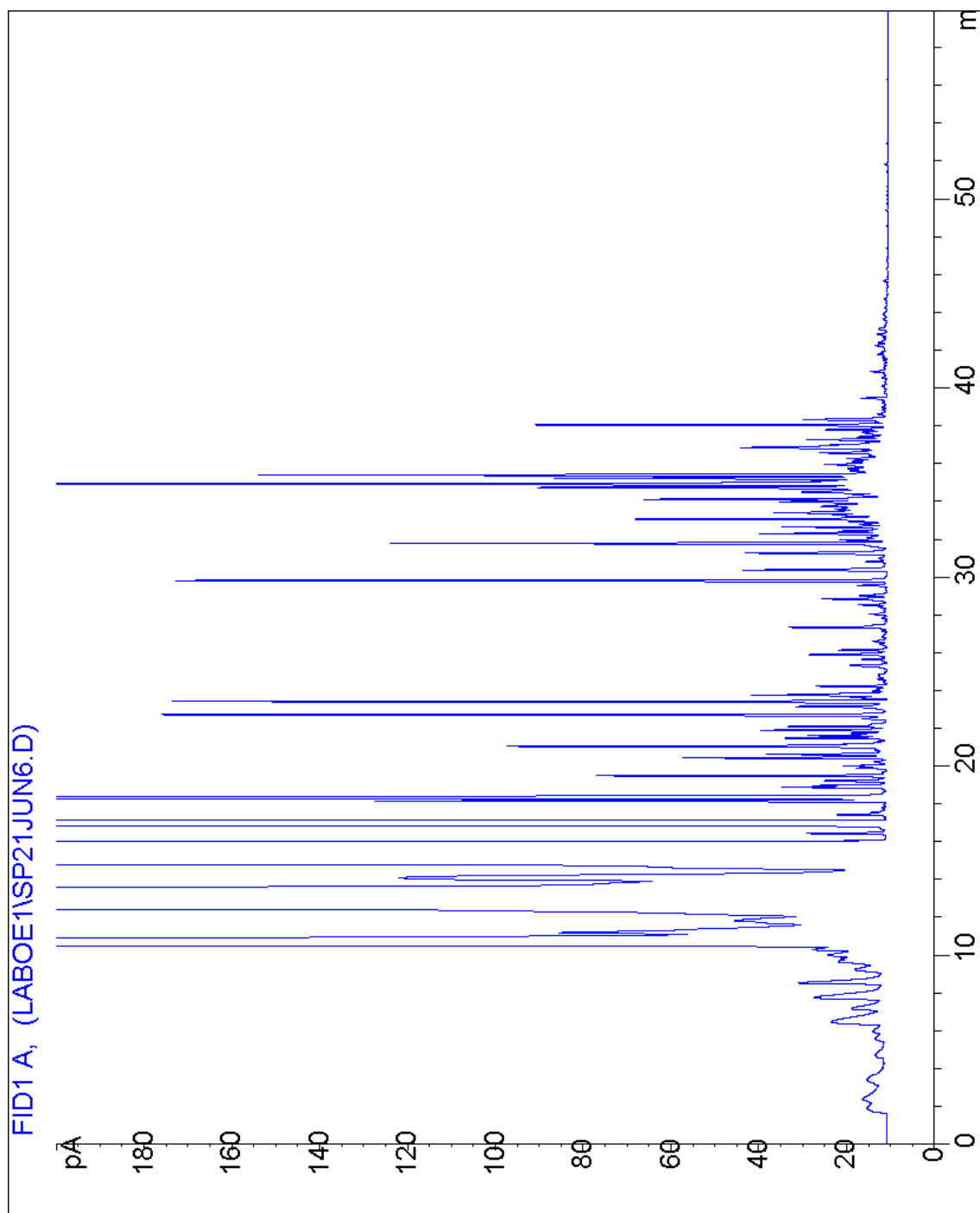


Figura 4. Cromatograma das substâncias voláteis da amostra de suco de lima ácida (biodinâmico) extraídos por MEFS, em 60 minutos, com adição de sal, em microfibra de PDMS/DVB

Reto *et al.* (2007) determinaram vitamina K em folhas de chá verde e infusões de nove marcas de chá verde comercializado em Portugal. A análise foi realizada através da MEFS/CG-FID, utilizando as microfibras de PDMS (75µm), PA (85µm), PDMS/DVB e DVB/CAR, sendo a melhor condição de análise quando utilizaram a microfibra PDMS, com adsorção por imersão a 40°C/45 minutos. O sal (NaCl) foi adicionado em 3 concentrações (0%, 8% e 10%), mostrando que foi importante na análise. A adição de 10% de sal promoveu maior adsorção das substâncias voláteis. Os resultados obtidos por Reto *et al.* (2007) comprovam a melhoria da adsorção de substâncias voláteis com a adição de sal às amostras encontradas na presente dissertação utilizando a lima ácida.

Nos métodos de extração de substâncias voláteis utilizados, rotineiramente, as substâncias voláteis podem ser perdidas devido à manipulação excessiva da amostra, possibilitando a formação de artefatos, sendo contaminadas pelos solventes. Deve-se, também, considerar que envolvem uma série de etapas, que demandam tempo de análise excessivamente longo. Portanto, a MEFS minimizou todas estas limitantes na adsorção de substâncias voláteis.

Carvalho *et al.* (2000 e 2002) utilizaram a MEFS com imersão da microfibra e, posterior identificação por CGAR/EM, em sucos de abacaxi: integrais, hidrolisados e clarificados por ultrafiltração (UF) e microfiltração (MF), observando maior teor de voláteis no suco integral. Foram identificadas 31 substâncias voláteis.

No caso dos frutos cítricos, o limoneno é a substância mais abundante dentre os hidrocarbonetos monoterpênicos presentes, sendo uma substância não polar, aparecendo, também, abundantemente nos óleos essenciais da casca de frutas cítricas (Hendrix e Redd, 1990).

A MEFS também é uma ferramenta útil na identificação de substâncias formadas por processos oxidativos, como o óxido de limoneno, de sabor e aroma indesejáveis, produto da oxidação do limoneno (Marine e Clemons, 2003).

Vichi *et al.* (2006) utilizaram a MEFS e a CGAR/EM para avaliar monoterpênicos e sesquiterpênicos em azeite virgem. As fibras testadas foram PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS e CW/DVB, com temperatura de adsorção de 40, 60, 80 e 100°C e com tempo de adsorção de 30 e 60 minutos. Comportamentos distintos foram identificados para mono e sesquiterpênicos presentes em azeite virgem. A microfibra de

DVB/CAR/PDMS foi a que revelou melhor resposta cromatográfica, quando exposta em *headspace* por 60 minutos.

### **Identificação e Quantificação das Substâncias Voláteis dos Sucos de Lima ácida Convencional e Biodinâmica**

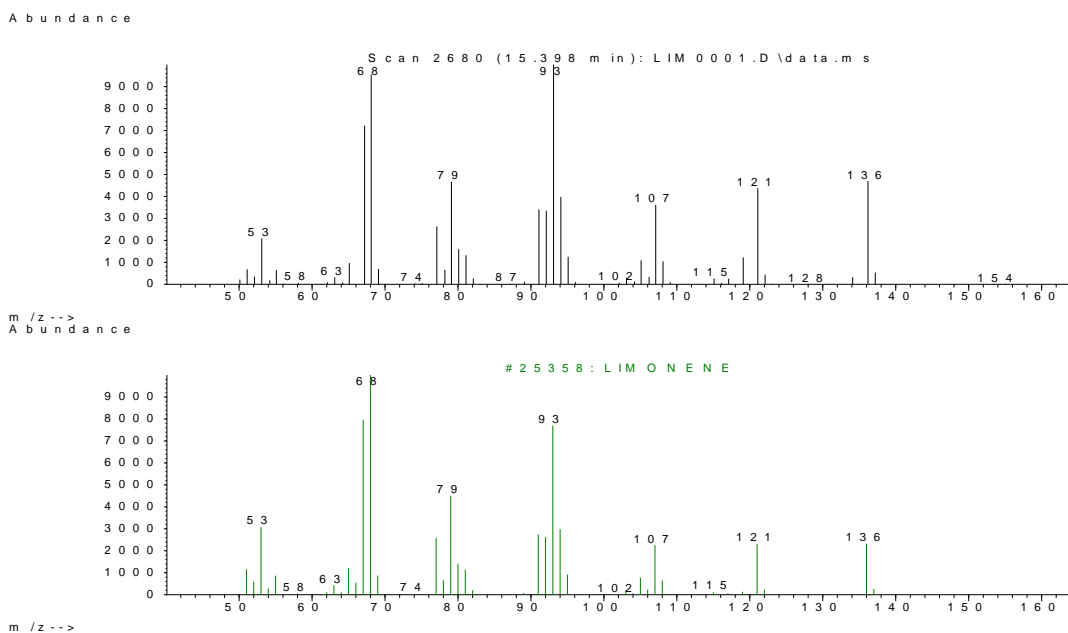
Foram identificadas 40 substâncias voláteis em ambos os sucos de lima ácida tanto na forma convencional quanto na biodinâmica (Quadro 5), podendo ainda observar-se que 38 daquelas identificadas apresentaram valores idênticos entre as amostras orgânica biodinâmica e convencional, encontrando-se hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos e ésteres.

O limoneno foi o composto volátil mais abundante em ambas as amostras de limão biodinâmico e convencional, representando 57,28% e 55,25% respectivamente, do total de substâncias voláteis encontradas, seguido pelo *cis*-ocimeno em 17,48% no suco biodinâmico e 15,62% no suco convencional e o  $\beta$ -pineno com 10,34% de área do pico em ambas as amostras. O espectro de massa do limoneno encontrado nas amostras de suco de lima ácida convencional pode ser observado na Figura 5. O limoneno foi identificado por Kim *et al.* (2003) como a substância volátil mais abundante no chá de yuzu (*Citrus junus*), bem como por Cserhalmi *et al.* (2006) em sucos de limão, *grapefruit*, laranja e tangerina. Moufida e Marzouk (2003) o identificaram em sucos de laranja, bergamota e limão.

**Quadro 5. Identificação das substâncias voláteis dos sucos de lima ácida convencional e biodinâmica**

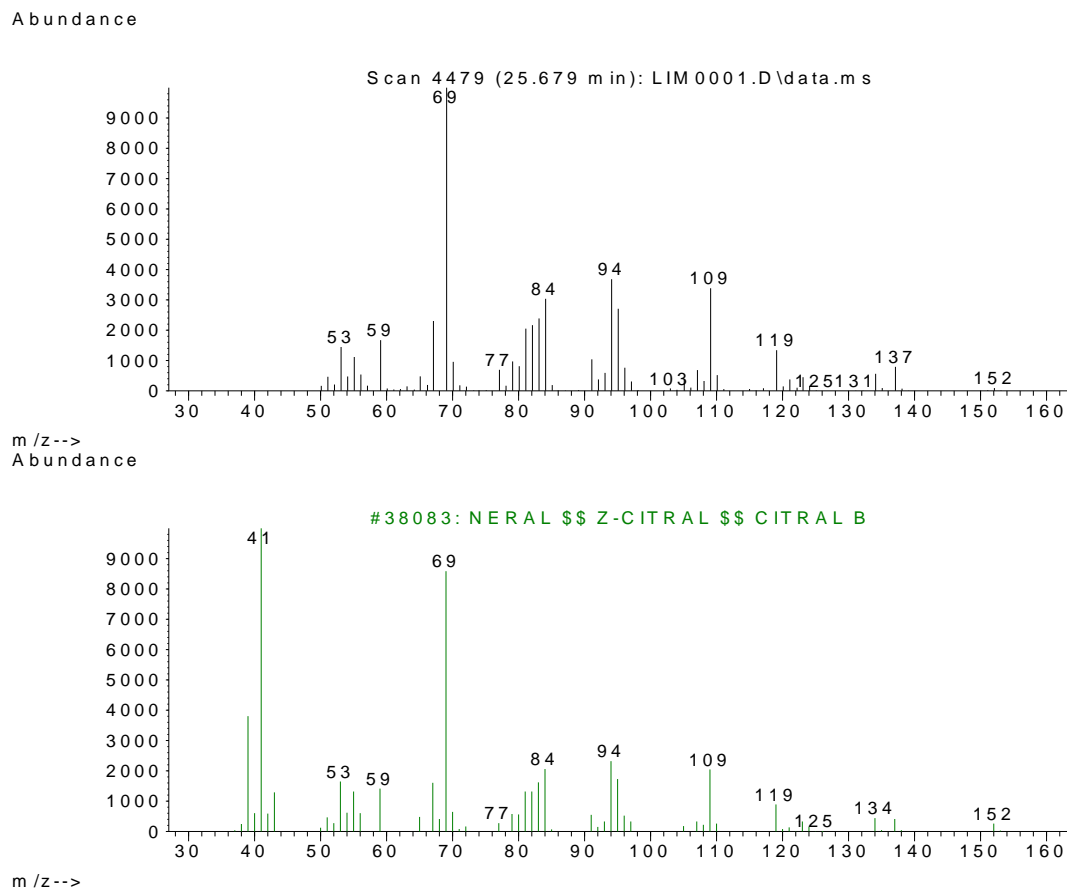
Nº do pico	Tempo de Retenção (minutos)	Índice de Kovats Calculado	Índice de Kovats Tabelado	Substância Volátil	ÁREA DO PICO (%) Convencional	Área do pico (%) Biodinâmico
7	9,785	922	927	triciclono	0,06	0,06
8	10,105	929	930	$\alpha$ - tujeno	0,15	0,15
9	10,397	936	939	$\alpha$ - pineno	0,05	0,05
10	10,985	949	954	Canfeno	2,54	2,54
12	12,420	979	979	$\beta$ - pineno	10,34	10,34
14	13,317	992	991	$\beta$ - mirceno	3,89	3,89
16	13,774	1005	1003	$\alpha$ - felandreno	0,25	0,23
17	15,380	1039	1029	Limoneno	55,25	57,28
18	15,889	1042	1037	Cis-ocimeno	15,62	17,48
19	16,278	1054	1050	Trans- $\beta$ - ocimeno	0,03	0,03
20	16,666	1066	1060	$\gamma$ - terpineno	4,04	4,04
21	17,318	1073	1073	Ciclohexeno	0,10	0,10
22	17,964	1086	1088	Isoterpinoleno	0,12	0,11
23	18,107	1090	1089	Terpinoleno	1,17	1,15
24	18,770	1099	1098	Linalool	0,39	0,39
25	19,278	1112	1117	Fenchol	0,08	0,08
28	20,398	1136	1138	Cis-p-mentol	0,14	0,14
29	20,947	1145	1150	Hidrato de canfeno	1,10	1,86
32	21,867	1166	1169	Endo-borneol	0,53	0,53
33	22,496	1178	1177	Terpinen-4-ol	2,33	2,33
35	23,187	1190	1189	$\alpha$ - terpineol	0,41	0,41
37	23,970	1206	1202	Decanal	0,03	0,02
38	25,085	1230	1230	Nerol	0,10	0,09
39	25,668	1242	1238	Neral	0,02	0,02
40	26,417	1248	1253	Geraniol	0,03	0,03
41	27,125	1272	1267	Geranial	0,15	0,15
42	28,434	1295	1300	Tridecano	0,04	0,04
46	30,114	1336	1338	$\Delta$ - elemeno	0,08	0,08
48	30,972	1356	1353	Acetato de citronelila	0,09	0,09
49	31,532	1367	1362	Acetato de nerila	0,18	0,18
52	32,372	1385	1381	Acetato de geranila	0,09	0,09
53	32,995	1394	1400	Tetradecano	0,18	0,16
55	33,635	1411	1413	Cis- $\alpha$ - bergamoteno	0,09	0,09
56	33,807	1418	1419	$\beta$ - cariofileno	0,17	0,14
58	34,567	1434	1435	Trans $\alpha$ - bergamoteno	0,07	0,07
61	35,258	1449	1455	$\alpha$ - humuleno	0,48	0,48
62	35,493	1457	1457	Trans - $\beta$ - farneseno	0,43	0,43
65	36,253	1475	1477	$\gamma$ - gurjuneno	0,08	0,09
67	36,910	1491	1493	$\Delta$ - selineno	0,21	0,20
68	37,041	1494	1498	$\alpha$ - selineno	0,07	0,07
69	37,447	1503	1504	Trans- $\alpha$ - bisaboleno	0,04	0,04
70	37,716	1509	1509	$\beta$ - bisaboleno	0,05	0,05
71	37,973	1516	1515	Cis- $\gamma$ - bisaboleno	0,18	0,18

A ocorrência do limoneno em frutos no estágio ótimo de maturação é também verificada em frutos não cítricos, como as cerejas (*Prunus avium*), cv. Bing, citada por Mattheis e Fellman (1992), porém em menores concentrações. As substâncias voláteis responsáveis pelo aroma podem variar de acordo com o estágio de maturação do fruto sendo necessário que sejam analisados em estágio ótimo de maturação.



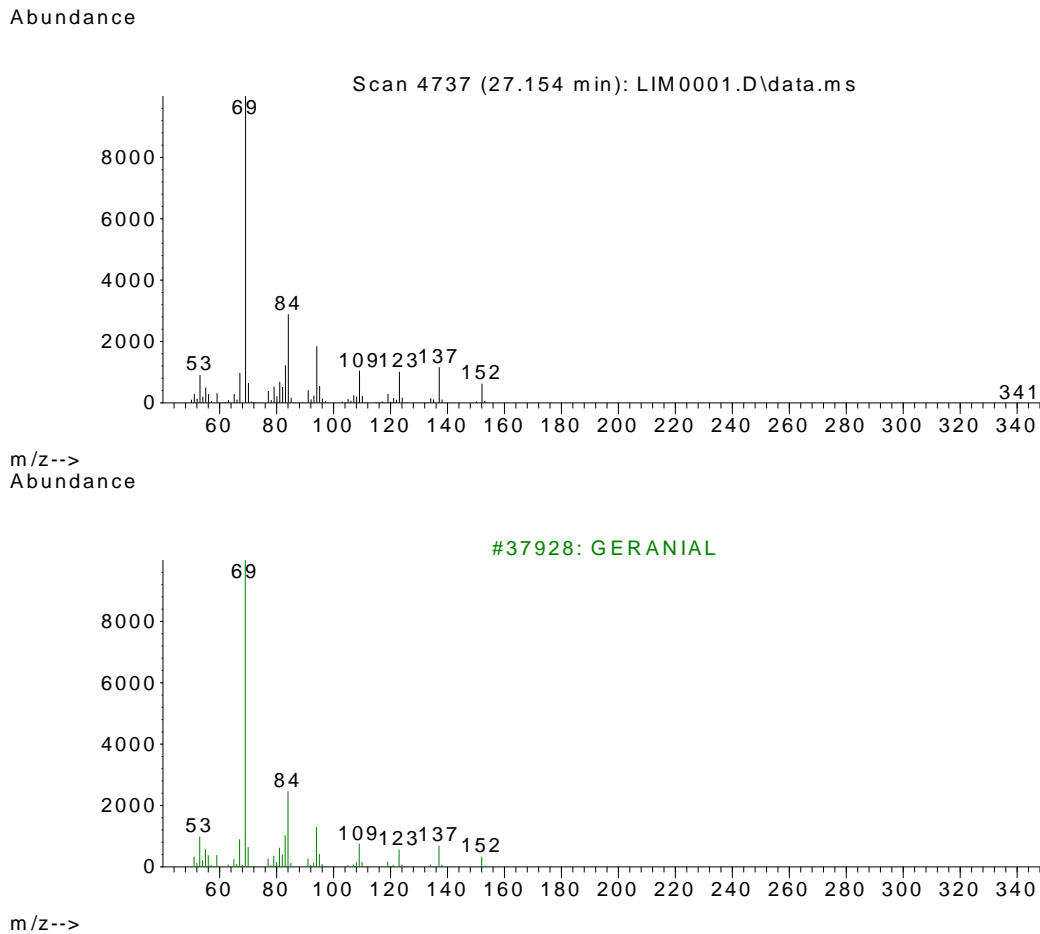
**Figura 5. Espectros de massa do limoneno no suco de lima ácida convencional e da espectroteca Wiley**

Foram identificados: o neral 0,02% de área de pico, o nerol com 0,09% (biodinâmico) e 0,10% (convencional), o terpineno com 4,04%, o geraniol com 0,03% e geranial com 0,15%, substâncias estas responsáveis pelo maior impacto no aroma de limão (Cserhalmi *et al.*, 2006). Nas Figuras 6 e 7 podem ser observados os espectros de massa do neral e do geranial. Cserhalmi *et al.* (2006) identificaram no suco de limão as mesmas substâncias de impacto no aroma encontradas neste trabalho.



**Figura 6. Espectro de massa do neral no suco de lima ácida convencional e da espectroteca Wiley**

Identificou-se o  $\alpha$ -terpineol (0,41%) e o terpinen-4-ol (2,33%), em ambas as amostras, substâncias responsáveis pelo *off-flavor* de sucos de limão, anteriormente também reportadas por Cserhalmi *et al.* (2006).



**Figura 7. Espectro de massa do geranial no suco de lima ácida convencional e espectroteca Wiley**

Cserhalmi *et al.* (2006) avaliaram entre outros parâmetros físicos e químicos, as substâncias voláteis por MEFS (microfibra de PDMS) com *headspace*, seguida por CGAR/EM em sucos integrais de *grapefruit*, limão, laranja e tangerina antes e após a aplicação de campo elétrico pulsante como alternativa ao processamento térmico. Sendo observado que o butirato de etila, o linalool, o decanal e o valenceno não foram perdidos, significativamente, no suco de laranja. No suco de limão não houve diminuição significativa na quantidade de neral e geranial, substâncias de impacto no aroma do limão, enquanto que o  $\alpha$ -terpineol e o terpinen-4-ol, responsáveis pelo *off-favor*, permaneceram sem alteração após o processo. Similarmente, o *nootkatone*, aroma

chave na composição volátil do *grapefruit*, não sofreu perdas. Não houve perda de substâncias voláteis no suco de tangerina. Foram identificadas, ainda, as substâncias de maior impacto no aroma do limão: neral, nerol, terpineno e geraniol, também encontradas nas amostras analisadas (convencional e biodinâmico) neste trabalho. O limoneno, substância mais abundante nos sucos de limão e de outros cítricos, também foi identificado nos sucos de lima ácida analisados (Figura 6), bem como: linalool,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineol (*off-flavor*), cis-ocimeno e geraniol. Moufida e Marzouk (2003) e Cserhalmi *et al.* (2006) analisando as substâncias voláteis em sucos de laranja, bergamota e limão encontraram as substâncias acima reportadas. De acordo com os dados encontrados, também observou-se que a quantidade de substâncias voláteis responsáveis pelo *off-flavor* no suco lima ácida orgânica biodinâmica foi elevado.

O geraniol,  $\alpha$ -gurjuneno, geraniol,  $\beta$ -selineno, tujopseno encontradas em ambos os sucos de lima ácida, convencional e biodinâmico, foram também encontradas por Prudente *et al.* (2003) que identificaram 30 substâncias voláteis no suco e óleo essencial do calamondin.

O conteúdo total de substâncias voláteis encontradas nos sucos de lima ácida, convencional e biodinâmico, foi de 40,3 $\mu$ g/g e 75,2 $\mu$ g/g, respectivamente (Quadro 6). Moufida e Marzouk (2003) caracterizaram cultivares de *blood orange*, *sweet orange*, limão, bergamota e *bitter orange*, concluindo que o limão (140.75 $\mu$ g/mL) quando comparado a *sweet orange* (344.46  $\mu$ g/mL) e a bergamota (355.94 $\mu$ g/mL) apresenta menor quantidade de substâncias voláteis responsáveis pelo aroma.

O limoneno foi encontrado em maior concentração no suco de lima ácida convencional (20,8 $\mu$ g/g), enquanto que o biodinâmico apresentou 16,8 $\mu$ g/g.

Os teores das substâncias de impacto no *flavor* do limão foram iguais quanto ao neral que apresentou 0,1 $\mu$ g/g em ambos os sucos convencional e biodinâmico, porém o conteúdo de geraniol foi de 0,1 $\mu$ g/g suco da lima ácida convencional e de 0,2 $\mu$ g/g no biodinâmico.



**Quadro 6. Quantificação das substâncias voláteis nos sucos de lima ácida por cultivo convencional e biodinâmico**

Nº do pico	Tempo de Retenção (minutos)	Nome da Substância Volátil	Área do pico (%) convencional	Área do pico (%) biodinâmico	Quantidade µg/g convencional	Quantidade µg/g biodinâmico
7	9,785	Triciclono	-	-	Traços	traços
8	10,105	$\alpha$ - tujeno	-	-	Traços	traços
9	10,397	$\alpha$ - pineno	1,909	1,004	0,9	0,4
10	10,985	Canfeno	0,702	0,714	0,3	0,3
12	12,420	$\beta$ - pineno	5,136	3,468	2,5	1,4
14	13,317	$\beta$ - mirceno	1,799	1,945	0,9	0,8
16	13,774	$\alpha$ - felandreno	0,529	0,331	0,3	0,2
17	15,380	Limoneno	42,431	41,169	20,8	16,8
18	15,889	Cis-ocimeno	-	0,172	Traços	0,1
19	16,278	Trans- $\beta$ - ocimeno	0,382	0,387	0,2	0,2
20	16,666	$\gamma$ - terpineno	10,972	8,438	5,4	3,4
21	17,318	Ciclohexeno	-	-	traços	traços
22	17,964	Isoterpinoleno	-	-	traços	traços
23	18,107	Terpinoleno	0,502	0,358	0,2	0,1
24	18,770	Linalool	0,215	0,425	0,1	0,2
25	19,278	Fenchol	0,363	0,503	0,2	0,2
28	20,398	Cis-p-mentol	0,203	0,128	0,1	0,1
29	20,947	Hidrato de canfeno	0,200	0,242	0,1	0,1
32	21,867	Endo-borneol	0,390	0,616	0,2	0,3
33	22,496	Terpinen-4-ol	2,375	3,559	1,2	1,5
35	23,187	$\alpha$ - terpineol	4,488	7,319	2,2	3,0
37	23,970	Decanal	0,431	0,376	0,2	0,2
38	25,085	Nerol	1,508	0,388	0,1	0,2
39	25,668	Neral	0,233	0,234	0,1	0,1
40	26,417	Geraniol	1,336	0,315	0,1	0,1
41	27,125	Geranial	0,256	0,513	0,1	0,2
42	28,434	Tridecano	0,208	0,423	0,1	0,2
46	30,114	$\Delta$ - elemeno	0,330	0,455	0,2	0,2
48	30,972	Acetato de citronelila	0,594	0,104	0,1	0,1
49	31,532	Acetato de nerila	0,201	1,875	0,1	0,8
52	32,372	Acetato de geranila	0,283	0,601	0,1	0,2
53	32,995	Tetradecano	0,448	0,127	0,2	0,1
55	33,635	Cis- $\alpha$ - bergamoteno	0,182	0,144	0,1	0,1
56	33,807	$\beta$ - cariofileno	0,666	0,623	0,3	0,3
58	34,567	Trans $\alpha$ - bergamoteno	0,284	0,474	0,1	0,2
61	35,258	$\alpha$ - humuleno	1,789	1,403	0,9	0,6
62	35,493	Trans - $\beta$ - farneseno	0,222	0,204	0,1	0,1
65	36,253	$\gamma$ - gurjuneno	0,898	0,344	0,1	0,2
67	36,910	$\Delta$ - selineno	0,244	0,259	0,1	0,1
68	37,041	$\alpha$ - selineno	0,144	0,124	0,1	0,1
69	37,447	Trans- $\alpha$ - bisaboleno	0,261	0,110	0,1	0,1
70	37,716	$\beta$ - bisaboleno	0,353	0,300	0,1	0,1
71	37,973	Cis- $\gamma$ - bisaboleno	2,714	3,877	1,3	1,6

Substâncias como triciclono,  $\alpha$ -tujeno, ciclohexeno e isoterpinoleno foram encontradas em quantidades traço, podendo ser quantificados em ambos os sucos. O mesmo não se observou quanto ao cis-ocimeno, que apesar de ter sido encontrado em quantidades traço nas amostras de suco de lima ácida convencional, pôde ser quantificada (0,1 $\mu$ g/g) nas amostras de suco de lima ácida biodinâmica.

De forma geral, das 40 substâncias voláteis identificadas e quantificadas, 21 substâncias apresentaram diferença quanto aos seus teores quando comparadas entre as amostras de suco de lima ácida convencional e biodinâmica. São elas: o  $\alpha$ -pineno, o  $\beta$ -pineno, o  $\beta$ -mirceno, o  $\alpha$ -felandreno, o limoneno, o terpinoleno, o linalool, o endoborneol, o terpinen-4-ol, o  $\alpha$ -terpineol, o nerol, o geranial, o tridecano, o acetato de nerila, o acetato de geranila, o tetradecano, o trans- $\alpha$ -bergamoteno, o  $\alpha$ -humuleno, o  $\gamma$ -gurjuneno e o cis- $\gamma$ -bisaboleno. Dentre elas encontram-se o nerol e o geranial que são substâncias de impacto e ainda, o terpinen-4-ol substância responsável pelo *off-flavor*. As demais substâncias não citadas (14), não apresentaram diferença na sua quantificação, quando comparadas entre os sucos de lima ácida de cultivos convencional e biodinâmico.

## **CONCLUSÃO**

A técnica de MEFS se mostrou eficiente na adsorção das substâncias voláteis dos sucos de lima ácida convencional e biodinâmico.

A microfibra mais eficiente, quando adicionou-se NaCl, foi a de PDMS/DVB nas condições de 30 min. de estabilização e 15 min. de adsorção.

Foi identificado um total de 40 substâncias voláteis em ambos os sucos de lima ácida, sendo 36 delas quantificadas no suco convencional e 37 no biodinâmico. O limoneno foi a substância volátil que apresentou maiores teores tanto no suco de matéria-prima convencional e biodinâmica.

As substâncias de impacto no aroma do suco de lima ácida apresentaram teores mais elevados de terpineno no suco convencional e de nerol e geranial no suco biodinâmico, além do neral e do geraniol estarem presentes em ambos os sucos, na mesma concentração.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Acredita-se que a lima ácida, cv. Tahiti, orgânica biodinâmica seja promissora e comparável àquela convencional quanto às substâncias voláteis, apesar de, aparentemente, não haver diferenças entre as matérias-primas de cultivo convencional e biodinâmico. Atualmente, pode-se afirmar que a matéria-prima orgânica biodinâmica é mais sadia, devido ao seu manejo e condições limpas de cultivo, entre outros fatores relevantes.

A regulamentação do setor de produção orgânica e orgânica biodinâmica irá garantir a qualidade do produto, oferecendo segurança ao consumidor, pois será possível saber, por exemplo, qual tipo de insumo foi utilizado na produção de matérias-primas de origem vegetal e animal.

Mesmo com o atual crescimento da agricultura orgânica, esforços devem ser envidados para que se torne uma alternativa de abastecimento, tendo em vista a pequena oferta o que acarreta aumento no custo final ao consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPEL. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Limão. Disponível on line: [www.abpel.org.br/news1.htm](http://www.abpel.org.br/news1.htm). Acesso em 14/08/2006.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essencial Oil Components by CG/MS**. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois – USA, 1995. 469 p.
- AGRIANUAL 2002. **Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, Consultoria e Comércio, 2001. 536 p.
- ALTIERE, M. **Agroecologia**: bases científicas para uma agricultura sustentável. Guaíba Agropecuária, 2002. 592 p.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, V. 62, p. 2145-2148, 1990.
- AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; TADA, E. dos S.; RIVELLINO, S. R. Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. V. 873, p. 117-127, 2000.
- BAETA, A. **Perfil do Brasil Orgânico**. Seminário Josué de Castro – Disciplina do Curso de Mestrado em Nutrição da Universidade Federal do Rio de Janeiro, ministrada em 10/12/2004.
- BARROS, C. B. Óleos essenciais cítricos do Brasil. 2ed. **Rev. Atual**. Campinas, Fundação Cargill, 1986. 45p.
- BELARDI, R. & PAWLISZYN, J. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organic water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. **Water Polution Res. J.**, Canadá, V.24: 179, 1989.
- BONILLA, J.A. **Fundamentos da agricultura ecológica sobrevivência e qualidade de vida**. Nobel. São Paulo, 1992. 259 p.
- BORGES, A. L.; FANCELLI, M.; RITZINGER, C. H. S. P.; REINHARDT, D. H.; SILVA, N. M. B. da; TRINDADE, A. V.; SOUZA, L. S. **Aspectos gerais da produção orgânica de frutas**. In: Alimentos Orgânicos: produção, tecnologia e certificação. Paulo César Stringheta & José Roberto Muniz. Editora UFV, Viçosa. p.236-288, 2003.
- CARTER, R.D. **The Cuban Citrus Processing Industry**. Proc.19<sup>th</sup> Annual IFT Short Course for the Food Industry. Univ. Flórida. Gainesville, 1979.

- CARVALHO, L.M.J.; CABRAL, L.M.C.; SILVA, C.A.B. & ABADIO, F.D.B. Clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by UF. **Alimentaria**, V.316: 129 – 132, 2000.
- CARVALHO, L.M.J.C.; SILVA, C.A.B.; GODOY, R.L.O.; FIGUEIRA, J.A.F. & ABADIO, F.D.B. Volatile compounds in hydrolyzed pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill), Pérola variety and, clarified pasteurized juices obtained by solid-phase microextraction. **Alimentaria**, V.33: 127 – 132, 2002.
- CARVALHO, L.M.J.de. **Abacaxi (*Ananas comosus*, L. Merrill) cv. Pérola**: obtenção e avaliação de suco clarificado por membranas. Tese Submetida como Requisito para Obtenção do Grau de *Philosophae Doctor* em Fitotecnia. UFRRJ, RJ. 2004. 209 p.
- CHARITY, R. B. Fruticultura orgânica. **Agroecologia hoje**, Botucatu, V.2, n.9, p.16-18, 2001.
- CHITARRA, M.I.F; CHITARRA, A.B.; **Pós-colheita de frutos e hortaliças**: fisiologia e manuseio. Lavras - MG: FAEP, 1990. 230 p.
- CHYAU, Charng-Cherng; CHEN, Shu-Yueh; WU, Chung-May. Differences of volatile and nonvolatile constituents between mature and ripe guava (*Psidium guajava*, L.) *fruits*. **J. Agric. Food Chem.**, V.40: 846-849, 1992.
- COUNCIL REGULATION (EEC) n° 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring there to on agricultural products and food stuffs.
- COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6ed. Editora da UNICAMP, Série Manuais. Campinas, S.P., 1995.
- COUNCIL DIRECTIVE n° 2001/112/EC of 20 December 2001 relating to fruit juices and certain similar products intended for human consumption.
- CSEHALMI, Zs.; SASS-KISS, A; TÓTH-MARKUS, M. & LECHNER, N. Study of pulsed electric field treated citrus juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. V.7, Issue1-2, p.49-54, June, 2006.
- DAROLT, M. **Comparação entre a qualidade do alimento orgânico e a do convencional**. In: Alimentos Orgânicos: produção, tecnologia e certificação. Paulo César Stringheta & José Roberto Muniz. Editora UFV, Viçosa. p.289-312, 2003.

DOCELIMÃO. **Limão-Tahiti**. Disponível em <http://www.docelimao.com.br> . Acesso em 23/06/2005.

DUGO, G.; VERZERA, A.; STAGNO, H.; D'ALCONTRES; COTRONEO, A.; FÍCARRA, R. On the genuineness of citrus essential oils. Part XLI. Italian bitter orange essential oil: composition and detection of contamination and additions of oils and terpenes of sweet orange and of lemon. **Flav. Fragr. J.** V.8: 25 – 33, 1993.

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

ESKIN, N. A. M., **Biochemical changes in raw foods: fruits and vegetables**. In: Biochemistry of food. Academic Press, 2 ed. 69 – 165. California, 1990.

FALCONI FILHO, A. **Ser Holístico**. 2003. Disponível em: [www.acesa.com](http://www.acesa.com) . Acesso em 06/12/2005.

FIBL. **'Science' gets to heart of the 21-year DOK trial**. 2002. Disponível em: [http://www.fibl.net/english/fibl/pdf/annual\\_report\\_2002\\_soil\\_plants\\_science.pdf](http://www.fibl.net/english/fibl/pdf/annual_report_2002_soil_plants_science.pdf). Acesso em 20 de maio de 2004.

FOREIGN AGRICULTURE SERVICE. **Foreign Agriculture Circular – Citrus Fruits**. U.S. Dep. Agric. Serv., Washington, D.C. 1984-1990.

GALLIARD, T. **Degradation of plant lipids by hydrolytic and oxidative enzymes**. Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids. Academic Press, New York. p.319-357, 1975.

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

GUILLOT, S.; PEYTAVI, L.; BUREAU, S.; BOULANGER, R.; LEPOUTRE, J.P.; CROUZET, J.; GALINDO, S.S. Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and chromatography-olfacometry. **J. Agric. Food Chem.**, V.96: 147-155, 2006.

HENDRIX, C.M.; JR e REDD, J.B. **Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products**. In: Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages. D.Hicks (Editor). Nan Nostrand Reinhold, New York. 1990.

HULME. **The Biochemistry of Fruits and Their Products**. A Series of Monographs – Food Science and Technology. V.1. 1971. 620 p

IBD. **Diretrizes para o padrão de qualidade. ORGÂNICO INSTITUTO BIODINÂMICO.** 11ed. Botucatu, SP. IBD, 2004.

IFOAM - FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE MOVIMIENTOS DE AGRICULTURA ORGÂNICA. **Normas básicas de IFOAM para producción y procesamiento organico.** Ago, 2002.

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

KIM, T.H.; LEE, S.M.; KIM, Y.S.; KIM, K.H.; OH, S.; LEE, H.J. Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. **J. Agric. Food Chem.,** V.83: 151 – 158, 2003.

LEWINSOHN, E. et al. **Not Just Colors – Carotenoids Degradation as a Link Between Pigmentation and Aroma in Tomato and Watermelon Fruit.** Food Science a Technology Disponível em: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) . Acesso em 25/08/2005.

MACKU, C.; SHIBAMOTO, T. Application of Simultaneous Purging and Solvent Extraction Technique for Flavour Monitoring of Natural Product. **J. Agric. Food Chem.,** V.42: 121-127, 1991.

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

MARINE, S.S. & CLEMONS, J. Determination of limonene oxidation products using SPME and GC/MS. **Journal of Chromatographic Science.** V.41, (1): 31-35, 2003.

MATTHEIS, J.P.; T, D.A. & FELLMAN, J.K. Volatile Compounds by Sweet Cherries (*Prunus avium* , cv. Bing) During Fruit Development and Ripening. **J. Agric. Food Chem.** V.40: 471-474, 1992.

MOUFIDA, S. & MARZOUK, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. **Phytochemistry.** V.62: 1283 – 1289, 2003.

NAGY, S.; CHEN, C.S.; SHAU, P.E. (Editores). **Fruit Juice Processing Tecnology.** Agscience, INC. Flórida. 1993. 713 p.

NARAIN, N. & BORA, S.P. Post-harvest changes in some volatile flavour constituents of yellow passion fruit (*Passiflora edulis*, f. *Flavicarpa*). **J. Sci. Food Agric.,** V.60: 529-530, 1992.

- NASSAR, A.M. “**Certificação de Agribusiness**”. In: Seminário Internacional Pensa Agribusiness: a gestão da qualidade dos alimentos, 9. cap.3 (16-30). 1999.
- OLIAS, J. M.; SANZ, C.; RIOS, J. J. & PERES, A. G. **Substrates specificity of alcohol acyltransferase from strawberry and banana fruits**. In: Fruit Flavors. ACS Symposium Series, 596: 135 – 141, 1995.
- OLIVEIRA, E. (1) **Produtos Orgânicos, Além de Corretos, Criativos**. Jornal O Globo. 09/07/2006. p.41.
- OLIVEIRA, Emilly Rita Maria de. (2) **Análise de flavor por microextração em fase sólida (SPME)**. Dissertação submetida como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências. UFRRJ, RJ. 2006. 77p.
- ORMOND, J.G.P. et al. **Agricultura Orgânica: quando o passado é futuro**. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, n.15, p. 3-34. Mar., 2002.
- PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction: theory and practice**. New York: Wiley-VHC, Inc, 247p., 1997.
- PEDRÃO, M.R.; BELEIA, A.; MODESTA, R.C.D.; PURDENCIO-FERREIRA, S.H. Estabilidade físico-química e sensorial do suco de limão Tahiti natural e adoçado, congelado. **Ciência e Tecnol. de Alimentos**. V.19, n.2. Maio/Agosto, 1999.
- PINO, J. A. Los Constituyentes Volatiles de las Frutas Tropicales IV. Kiwi, Carambola y Mangostán. **Alimentaria – Revista de Tecnologia e Higiene de los Alimentos**. Octubre, 47 – 50. 1997.
- PINO, J. A. Los Constituyentes Volatiles del Tamarindo (*tamarindus indica L.*). **Alimentaria – Revista de Tecnologia e Higiene de los Alimentos**. N292: Maio, 85 – 87. 1998.
- PRUDENTE, A.D.; XU, Z. & KING, J.M. **Comparison of volatile components between ripe and unripe Calamondin (*Citrofortunella mitis*, J. Ingram and H.E. Moore)**. IFT Annual Meeting. Sessão 45C – Food Chemistry: flavor and aroma activity. Chicago/ USA, 2003.
- RAUPP, J. & U.J. KONIG. Biodynamic preparations cause opposite yield effects depending upon yield levels. **Biol. Agric. & Hort.** V.13, 175-188. 1996.
- REIJNTJES, C.; HAVERKORT, B.; WATERS-BAYER, A. **Agricultura para o futuro: uma introdução à agricultura sustentável e de baixo uso de insumos externos**. Rio de Janeiro AS-PTA, 1994. 324 p.



RETO, M.; FIGUEIRA, M.E.; FILIPE, H.M.; ALMEIDA, C.M.M. Analyses of vitamin K in green tea leaves and infusions by SPME-GC-FID. **J. Agric. Food Chem.**, V.100: 405-411, 2007. Disponível em [www.elsevier.com/locate/food\\_chem](http://www.elsevier.com/locate/food_chem). Acesso em 08/08/2006.

RIU-AUMATELL, M.R.; CASTELLARI, M.; LÓPEZ-TAMAMES, E.; GALASSI, S. & BUXADERS, S. Characterization of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. **J. Agric. Food Chem.**, V.87, p.627-637, 2004.

SAMPAIO, T.S. & NOGUEIRA, P.C.L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa*, Gomes) at three stages of maturation. **J. Agric. Food Chem.**, V.95: 606-610, 2006.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA – DAS. [http: www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br) Secretaria de Origem Animal – SDA. Instrução Normativa nº7 de 17 de maio de 1999. Publicada no DOU de 19/5/99, seção I, p.11.

SHEUNG, K.S.M.; MIN, S.; SASTRY, SK. Dynamic headspace analyses of orange juice flavour compounds and their adsorption into packaging materials. **J. Food Sci.** V.69 (7): C549 – 556, 2004.

SOUFLEROS, E.H.; PISSA, I.; PETRIDIS, E.; LIGERAKYS, M.; MERMELAS, K.; BOUKOUVALAS, G. & TSIMITAKIS, E. Instrumental analysis of volatile and other compounds in Greek kiwi wine: sensory evaluation and optimizations of its composition. **J. Agric. Food Chem.**, V.75: 487 – 500, 2001.

STACK, J. B.; JOE JR., F.L.; CUNNINGHAM, D.C.; FAZIO, T.; ROACH, J.A.G. Gas Chromatographic Determination of Fatty Acids and Sterols in Orange Juice. **J. Assoc. Off. Chem.** V.69, 551-556. 1986.

STEFFEN, A.; PAWLISZYN, J. Analyses of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction. **J. Agric. Food Chem.** V. 44, 2187-2193, 1996.

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

SWINGLE, W.T. **The Botany of Citrus and Its Relatives of the Orange Subfamily**. In: Webber, H.J., Batchelor, L.D. Citrus Industry. Univ. Cal. Press, Berkeley, 129-474. 1943.

- TIRADO, C.B.; STASHENKO, M.Y.; COMBARIZA, J.R. & MARTINEZ, J.R. Comparative study of colombian citrus oils by HRGC and GCMS. **Journal Chromatography A**, V.697: 501 – 513, 1995.
- TONDER, D.; PETERSEN, M.A.; POLL, L.; OLSEN, C.E. Discrimination between freshly made and stored reconstituted orange juice using GC odour profiling and aroma values. **J. Agric. Food Chem.**, V.61 (1/2): 223 – 229, 1998.
- TRESSL, R. & ALBRECHT, W. Biogenesis of aroma compounds through acyl pathways. **Am. Chem. Soc.** 115 – 133, 1986.
- TRIVELLATO, M. D.; FREITAS, G. B. de. **Panorama da agricultura orgânica. In: Alimentos Orgânicos: produção, tecnologia e certificação.** Paulo César Stringheta & José Roberto Muniz. Editora UFV, Viçosa. p.9-35, 2003.
- USDA - United States Department of Agriculture. **Concetrated lemon juice for manufacturing.** USDA, Washington, D.C., 1989.
- USDA - United States Department of Agriculture. **Nutrient Database for Standard Reference.** Release 14 (Julho 2001).
- USDA - United States Department of Agriculture. **National Nutrient Database for Standard Reference.** Release 18 (2005).
- VANOLI, M.; VISAI, C. & RIZZOLO, A. The influence of harvest date on the volatile composition of “ Starkspur Golden” apples. **Postharvest Biology and Technology**, V.6: 225-234, 1995.
- VENDRAMINI, A. L. A. **Estudo de componentes de acerola (*Malphigia puniceifolia*, L.) em diferentes estágios de maturação.** Tese Submetida como Requisito para Obtenção do Grau de Mestre em Ciência de Alimentos. UFRJ, RJ. 1997. 85 p.
- VICHI, S.; GUADAYOL, J.M.; CAIXACH, J.; TAMAMES, E.L.; BUXADERAS, S. Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. V.1125: 117-123, 2006.
- VICK, B. & ZIMMERMAN, A. The lipoxygenase pathway. **Plant Physiol.** V.57: 780, 1976.
- VISAI, C. & VANOLI, M. Volatile compounds production during growth and ripening of peaches and nectarines. **Scientia Horticulturae.** V.70: 15 – 24, 1997.

WIKIPEDIA. **ANTROPOSOFIA**. Disponível em [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org) .Acesso em 06/12/2005.

WINSTINGHAUSEN, C.V.W.; SCHEIBE, E.V.; WINSTINGHAUSEN, U.J.; KONIG. **The Biodynamic Spray and Compost Preparations** – production methods. Booklet n.1. Stroud, 1. edition, Publ. Biodynamic Agricultural Association UK. 1998.

ZAKABI, R. A Mania dos Orgânicos: os alimentos sem agrotóxicos viram moda ao vender a idéia de que são mais saudáveis. **Revista Veja**, Editora Abril. n.47, ano 38, edição 1932. 82 – 84. Novembro, 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)