

DETERMINAÇÃO DA ORIGEM BIOSINTÉTICA DE ÁCIDO ACÉTICO ATRAVÉS DA TÉCNICA “SITE SPECIFIC NATURAL ISOTOPIC FRACTIONATION STUDIED BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (SNIF-NMR)”

Elisângela Fabiana Boffo e Antonio Gilberto Ferreira*

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970, São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 15/2/05; aceito em 19/8/05; publicado na web em 8/2/06

BIOSYNTHETIC ORIGIN OF ACETIC ACID USING SNIF-NMR. The main purpose of this work is to describe the use of the technique Site-Specific Natural Isotopic Fractionation of hydrogen (SNIF-NMR), using ^2H and ^1H NMR spectroscopy, to investigate the biosynthetic origin of acetic acid in commercial samples of Brazilian vinegar. This method is based on the deuterium to hydrogen ratio at a specific position (methyl group) of acetic acid obtained by fermentation, through different biosynthetic mechanisms, which result in different isotopic ratios. We measured the isotopic ratio of vinegars obtained through C_3 , C_4 , and CAM biosynthetic mechanisms, blends of C_3 and C_4 (*agrins*) and synthetic acetic acid.

Keywords: SNIF-NMR; vinegar; plant metabolism.

INTRODUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear de alta resolução pode contribuir significativamente para a determinação da autenticidade quanto à origem geográfica e/ou biosintética de alimentos, através das medidas do conteúdo isotópico, em abundância natural, para sítios moleculares específicos.

A técnica conhecida como SNIF-NMR (“Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance”), foi desenvolvida no início dos anos 80, pelos Profs. Gérard e Maryvonne Martin na Universidade de Nantes, na França, para detectar a adição de açúcares não declarados ao processo de fermentação do vinho; procedimento esse chamado de enriquecimento ou “chaptalization”¹. O enriquecimento acontece quando há necessidade da adição de açúcar ao mosto da uva antes da fermentação com objetivo de aumentar o teor alcoólico e, conseqüentemente, a qualidade do vinho. Essa adição não se configura necessariamente em uma fraude, uma vez que é permitida dependendo das condições climáticas para uma determinada safra².

A técnica SNIF-NMR também tem sido utilizada para averiguar a adição de açúcares não declarados em outros produtos além do vinho^{3,4}, como por ex., em sucos de frutas⁵⁻⁷, mel⁸, tequila⁹, entre outros¹⁰⁻¹⁴. Sua aplicação consiste nas medidas conjuntas de ressonância magnética nuclear e de espectrometria de massas, sendo que a primeira determina a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$, e a segunda $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

A autenticidade de um suco, como por ex. o de laranja, pode ser determinada analisando-se a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ da metila do etanol, produzido a partir do processo de fermentação do suco, e comparada com a de outros produtos. Assim, o etanol derivado da fermentação do açúcar de beterraba é menos enriquecido em deutério que aquele fermentado a partir do suco de laranja e mais enriquecido quando é fermentado a partir do açúcar da cana-de-açúcar¹⁵.

O ácido acético, utilizado na produção do vinagre, é obtido basicamente pelos processos de oxidação do etanol (sinteticamente) ou de fermentação (biologicamente). No entanto, a fonte de etanol pode vir de várias origens, como cana-de-açúcar, uva, mel, laranja, maçã, entre outras. Desse modo, a caracterização do ácido acético nos vinagres é de grande importância para a indústria de

alimentos, uma vez que os custos da matéria-prima estão diretamente relacionados à sua origem¹⁶.

Muitos dos estudos já realizados, para vinagres e outros produtos, estão baseados na relação isotópica entre ^{13}C e ^{12}C obtida por meio da espectrometria de massas¹⁷. No entanto, essa técnica não é totalmente eficiente quando aplicada à detecção de adulterações que envolvam compostos oriundos de plantas que possuem o mesmo ciclo de fixação do carbono², como por ex., de plantas C_3 . Por isso, tornou-se necessária a implementação de uma técnica para superar essa dificuldade e a SNIF-NMR veio suprimir essa lacuna.

No presente trabalho descrevemos o uso da técnica SNIF-NMR no estudo da origem biosintética do ácido acético, encontrado em amostras comerciais de vinagres produzidos no Brasil, classificando-os de acordo com os diferentes metabolismos biosintéticos C_3 , C_4 e CAM; ciclos esses utilizados pelas plantas para fixação de gás carbônico¹⁸. Além disso, foram estudadas algumas amostras de *agrins*, que são vinagres obtidos a partir de uma mistura de ácido acético produzidos pela fermentação de açúcares da cana-de-açúcar e da uva. Nesses casos não são mencionadas, nos rótulos dos produtos comerciais, as relações das percentagens utilizadas nas misturas, constando apenas informações do grau de acidez ou se o produto é puro ou uma mistura (*agrins*).

PARTE EXPERIMENTAL**Extração do ácido acético**

Foram utilizados 80 mL de vinagre e 150 mL de éter etílico, em um processo de extração contínua líquido/líquido por 24 h. Ao término das extrações, as amostras, em um total de 21, foram concentradas utilizando-se um evaporador rotativo.

Medidas de RMN

Todas as medidas foram realizadas em um equipamento Bruker de 9,4 Tesla (400,13 MHz para frequência do hidrogênio), modelo DRX400, numa sonda de 5 mm para detecção direta de ^{31}P - ^{15}N , em triplicata e mantida a temperatura constante de 298 K durante todas as análises. Essas foram feitas utilizando-se 600 μL do ácido acético extraído, contendo ainda traços de água, etanol e

*e-mail: giba_04@yahoo.com.br

éter etílico, e adicionados 100 µL do padrão *N,N*-tetrametiluréia (TMU) 99%.

Espectros de RMN de ^1H

Foram acumulados 16 espectros para cada medida, com um tempo de aquisição de 8,39 s, janela espectral de 3906 Hz, utilizando-se um pulso de 90° com duração de 8,5 µs e tempo de espera entre os pulsos de 5 s. No processamento dos dados foi utilizado o preenchimento por zeros, zero “filling”, feita a correção automática da linha de base e não foi aplicado nenhum tratamento matemático no FID.

Espectros de RMN de ^2H

Os espectros de deutério foram adquiridos logo após aos de hidrogênio, sem a utilização do “lock” de ^{19}F . Foram acumulados 128 espectros, com tempo de aquisição de 8,59 s, janela espectral de 3906 Hz, utilizando-se um pulso de 90° com duração de 17,5 µs e tempo de espera entre os pulsos de 5 s. No processamento utilizou-se o mesmo número de pontos da aquisição, zero “filling”, uma multiplicação exponencial sobre o FID, “Line Broadening” (LB: 3,0 Hz) e foi feita a correção automática da linha de base.

Cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$

Para a determinação da relação $^2\text{H}/^1\text{H}$, utilizou-se a Equação 1¹⁹

$$\left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}}\right)^A = \frac{IA}{IP} * \frac{NP}{NA} * \frac{mP}{mA} * \frac{MA}{MP} \left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}}\right)^P \quad (1)$$

onde $(^2\text{H}/^1\text{H})^A$: relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ do composto de estudo, A; $(^2\text{H}/^1\text{H})^P$: relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ do padrão, TMU; IA e IP: área dos sinais de RMN para as metilas de A e do padrão, respectivamente; NA e NP: número estequiométrico de hidrogênios das metilas de A e do padrão, respectivamente; mA e mP: massa de A e do padrão, respectivamente; MA e MP: massa molar de A e do padrão, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de aumentarmos a concentração de ácido acético nas amostras, melhorando a relação sinal/ruído nos espectros de RMN de ^1H e ^2H e, por consequência, tornando as integrações desses sinais mais precisas, é que foram feitas as extrações do ácido acético nas amostras de vinagre. Além, evidentemente, de diminuirmos o tempo de máquina a ser utilizado.

Às amostras foram adicionados 100 µL de *N,N*-tetrametiluréia (TMU), obtendo-se uma intensidade do sinal da metila do ácido *versus* metila do TMU de aproximadamente 1:1. Isso para que tivéssemos uma boa visualização dos sinais, acarretando o menor erro possível na integração. Todos os espectros foram feitos nas mesmas condições para assegurarmos a reprodutibilidade das medidas.

Na Figura 1, podemos observar os espectros de RMN de a) ^1H e b) ^2H realizados após a extração, onde visualizamos os sinais referentes à metila do ácido acético (δ 2,05 ppm), do padrão TMU (δ 2,82 ppm) e da água (δ 6,70 ppm). É importante que a intensidade do sinal da água seja a menor possível a fim de não saturarmos o receptor de *rf* (“receiver”) com um sinal indesejado e conseqüentemente diminuirmos os demais. Os espectros de RMN de ^1H foram calibrados utilizando-se a referência interna tetrametilsilano (TMS) e os de ^2H utilizando-se o valor do deslocamento da metila do ácido acético, uma vez que o seu valor não difere do espectro de ^1H para o de ^2H ²⁰.

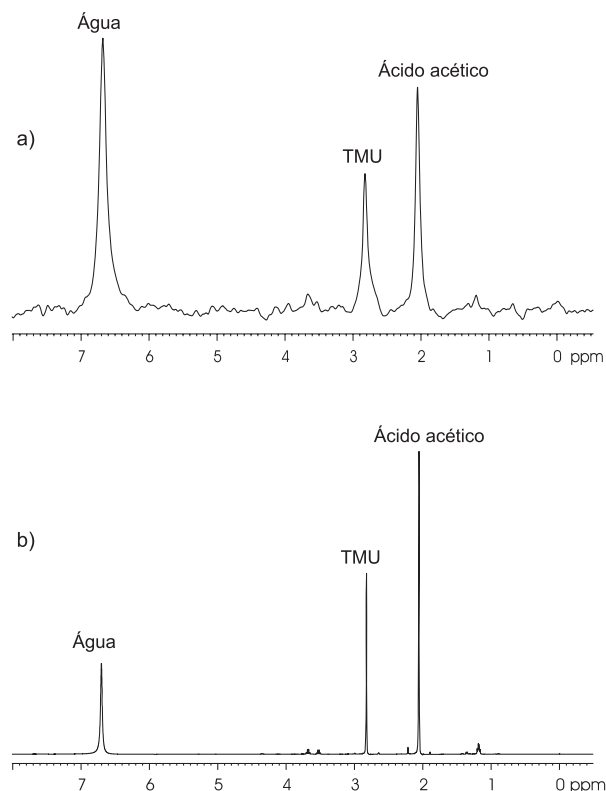


Figura 1. Espectros de RMN de a) ^1H e b) ^2H de um vinagre comercial

Os valores da relação isotópica encontrados para as amostras analisadas estão mostrados na Tabela 1.

A amostra de ácido acético sintético foi analisada com o intuito de verificar se o valor da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ da literatura e por nós obtido estavam condizentes²¹. Porém, encontramos um valor superior, não só para o ácido acético sintético, como também para as amostras com origem biossintética C3 e C4. Infelizmente não dispomos de dados na literatura para compararmos os valores quando se utilizam plantas com origem biossintética CAM.

Tabela 1. Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ para as amostras de vinagre

Vinagre	Relação Isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)**	Ciclo de fixação de CO_2
Maçã 1	99,8 (\pm 0,4)	C ₃
Maçã 2	100,8 (\pm 0,1)	C ₃
Vinho 1*	110,7 (\pm 0,1)	C ₃
Vinho 2*	109,2 (\pm 0,1)	C ₃
Vinho 3*	110,2 (\pm 0,3)	C ₃
Vinho 4*	109,5 (\pm 0,2)	C ₃
Vinho 5	109,5 (\pm 0,5)	C ₃
Vinho 6	109,2 (\pm 0,2)	C ₃
Vinho 7	110,6 (\pm 0,3)	C ₃
Vinho 8	110,1 (\pm 0,3)	C ₃
Vinho 9	110,6 (\pm 0,3)	C ₃
Arroz	111,8 (\pm 0,2)	C ₃
Laranja	100,3 (\pm 0,4)	C ₃
Mel	98,6 (\pm 0,4)	- - -
Abacaxi	106,0 (\pm 0,2)	CAM
Álcool 1	129,5 (\pm 0,4)	C ₄
Álcool 2	129,9 (\pm 0,2)	C ₄
Ácido acético sintético	153,5 (\pm 0,4)	- - -

* Amostras padrão. As demais são comerciais; ** valores médios das triplicatas

As amostras analisadas e que serviram para posterior comparação foram as quatro amostras autênticas de vinagres de vinho (padrão), onde obtivemos os valores 110,7, 109,2, 110,2 e 109,5 ppm. Essa aparente discrepância quando comparada com os valores encontrados na literatura, de aproximadamente 100 ppm, pode ser atribuída à variação isotópica devido às diferenças geográficas e/ou da influência da sazonalidade das plantas que deram origem aos açúcares²².

Para os vinagres obtidos a partir da fermentação dos açúcares oriundos de plantas C₃: maçã, vinho, arroz e laranja, encontramos valores da relação isotópica na faixa de 98,6 a 111,8 ppm. Esses valores estão próximos aos obtidos para as amostras autênticas de vinho e, portanto, podemos supor que não contêm adulterações.

Para os vinagres de mel e abacaxi, verificamos que o conteúdo isotópico do ácido acético em nossas amostras é semelhante ao do etanol originado da fermentação desses produtos, confirmando sua autenticidade^{8,16,22}. No entanto, o valor obtido para o vinagre de mel, se assemelhou ao dos vinagres oriundos de plantas C₃, isso provavelmente porque o néctar colhido pela abelha foi das flores de plantas que seguem esse mecanismo de fixação de CO₂⁸. Já para o abacaxi, oriundo de plantas CAM, os valores da relação isotópica são intermediários entre os valores dos grupos C₃ e C₄²². O valor por nós obtido, 106 ppm, não nos permite classificá-lo como pertencente ao grupo CAM e sim como C₃. Isso porque a faixa obtida para C₃ abrange os valores de 99,8 a 111,8 ppm. Portanto, a técnica SNIF-NMR sozinha não permite distinguir corretamente o vinagre de abacaxi. Provavelmente, com um número maior de amostras e de diferentes regiões, talvez possamos estabelecer um banco de dados que possibilite essa distinção.

Os vinagres oriundos de plantas C₄ apresentaram valores para a relação isotópica ²H/¹H superiores aos das plantas C₃, como esperado¹², e estando próximos a 130 ppm. Além disso, essas amostras não devem ter sido adulteradas, pois o etanol obtido da cana-de-açúcar é uma das matérias-primas mais baratas em nosso país. A causa mais provável da elevação nos valores da razão isotópica em relação aos da literatura deve-se, novamente, à influência geográfica e/ou da sazonalidade.

Na análise dos vinagres conhecidos como *agrins*, foi construída uma curva de calibração com amostras autênticas de vinagres de vinho e de álcool. As proporções e os respectivos valores da relação isotópica ²H/¹H estão mostrados na Tabela 2. O coeficiente angular (R = - 0,996) obtido a partir da equação da reta é bastante satisfatório.

Tabela 2. Proporções dos vinagres de vinho e álcool utilizados na curva de calibração

% dos vinagres		Relação isotópica ² H/ ¹ H (ppm)*
Vinho	Álcool	
100	0	110,7 (± 0,1)
80	20	114,6 (± 0,3)
60	40	117,8 (± 0,2)
40	60	121,9 (± 0,3)
20	80	127,3 (± 0,3)
0	100	129,7 (± 0,2)

* valores médios das triplicatas

Analisando-se os valores da relação isotópica ²H/¹H apresentados na Tabela 3, podemos verificar que a amostra *agrin* 1 apresenta 95% de ácido acético proveniente da oxidação do etanol oriundo da cana-de-açúcar. Já a amostra *agrin* 4 apresentou uma porcentagem maior de vinagre de vinho, 76%. Para as demais amostras obtivemos valores intermediários da relação isotópica e, conseqüentemente, da porcentagem de vinagre de cana-de-açúcar e de vinho.

Tabela 3. Relação isotópica ²H/¹H e as porcentagens dos vinagres de vinho e álcool para os *agrins*

Vinagre	Relação isotópica ² H/ ¹ H (ppm)*	% dos vinagres	
		Vinho	Álcool
<i>Agri</i> n 1	129,3 (± 0,2)	4,6	95,4
<i>Agri</i> n 2	124,3 (± 0,2)	29,9	70,1
<i>Agri</i> n 3	117,6 (± 0,2)	63,7	36,3
<i>Agri</i> n 4	115,2 (± 0,2)	76,0	24,0

* valores médios das triplicatas

CONCLUSÕES

Para as amostras dos *agrins* analisadas fica evidente que existe uma variação muito grande na sua composição quanto à origem biossintética (vinho *versus* cana-de-açúcar), refletindo tanto na qualidade quanto no preço final ao consumidor. Além disso, as informações descritas nos rótulos não certificam sua origem biossintética.

Foi possível estabelecer a origem biossintética para os vinagres oriundos de plantas que utilizam os metabolismos biossintéticos C₃ e C₄, mas não para os originados de plantas CAM.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e FAPESP.

REFERÊNCIAS

- Martin, G. J.; Guillou, C.; Martin, M. I.; Cabanis, M. T.; Tep, Y.; Aerny, J.; *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 316.
- Martin, G. G.; Martin, Y. L.; Naulet, N.; MCManus, H. J. D.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3206.
- Kosir, I. J.; Kocjancic, M.; Ogrinc, N.; Kidric, J.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *429*, 195.
- Ogrinc, N.; Kosir, I. J.; Kocjancic, M.; Kidric, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1432.
- Gonzalez, J.; Jamin, E.; Remaud, G.; Martin, Y.-L.; Martin, G. G.; Martin, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2200.
- Martin, G. G.; Hanote, V.; Lees, M.; Martin, Y.-L.; *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 62.
- Pupin, A. M.; Dennis, M. J.; Parker, I.; Kelly, S.; Bigwood, T.; Toledo, M. C. F.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1369.
- Lindner, P.; Bermann, E.; Gamarnik, B.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 139.
- Bauer-Christoph, C.; Christoph, N.; Aguilar-Cisneros, B. O.; López, M. G.; Richling, E.; Rossmann, A.; Schreier, P.; *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 438.
- Remaud, G.; Martin, Y.-L.; Martin, G. G.; Naulet, N.; Martin, G. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1844.
- Zhang, B.-L.; Buddrus, S.; Trierweiler, M.; Martin, G. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1374.
- Masud, Z.; Vallet, C.; Martin, G. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4693.
- Ogrinc, N.; Kosir, I. J.; Spangenberg, J. E.; Kidric, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 424.
- Martin, Y.-L.; *J. AOAC Int.* **1996**, *84*, 1509.
- Martin, G.; Guillou, C.; Martin, Y. L.; *Fruit Process.* **1995**, *5*, 246.
- Remaud, G.; Guillou, C.; Vallet, C.; Martin, G. J.; *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1992**, *342*, 457.
- Padovan, G. J.; Jong, D.; Rodríguez, L. P.; Marchini, J.; *Food Chem.* **2003**, *82*, 633.
- Coombs, J.; Hall, D. O.; Long, S. P.; Scurlock, J. M.; *Techniques in Bioproduktivty and Photosynthesis*, Pergamon Press: New York, 2nd ed., 1987.
- Zhang, B.-L.; Buddrus, S.; Martin, M. L.; *Bioorg. Chem.* **2000**, *28*, 1.
- Martin, G. J.; Martin, M. L.; Mabon, F.; Michon, M. J.; *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 311.
- Hermann, A.; *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *212*, 683.
- Zhang, B.-L.; Billault, I.; Li, X.; Mabon, F.; Remaud, G.; Martin, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1574.