

Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju

Isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$) and legality in cashew juice and pulp

Autores | Authors

✉ Ricardo FIGUEIRA

Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Biociências (IB)
Centro de Isótopos Estáveis Ambientais
Distrito de Rubião Jr., s/n
CEP: 18618-000
Botucatu/SP - Brasil
e-mail: ricardofigueira@hotmail.com

Andressa Milene Parente NOGUEIRA

Waldemar Gastoni VENTURINI FILHO

Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA)
Laboratório de Bebidas
Botucatu/SP - Brasil
e-mail: andressa_nogueira@fca.unesp.br
venturini@fca.unesp.br

Carlos DUCATTI

Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Biociências (IB)
Centro de Isótopos Estáveis Ambientais
Botucatu/SP - Brasil
e-mail: ducatti@ibb.unesp.br

Martha Maria MISCHAN

Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Instituto de Biociências (IB)
Laboratório de Bioestatística
Botucatu/SP - Brasil
e-mail: mmischan@ibb.unesp.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 04/08/2010
Aprovado | Approved: 20/05/2011
Publicado | Published: dez./2011

Resumo

Os objetivos deste trabalho foram utilizar o método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético C_3 em suco reconstituído e polpa de caju comerciais, e mensurar o limite de legalidade, com base na legislação brasileira, para identificar as bebidas que não estão em conformidade com as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os sucos foram produzidos em laboratório, conforme a legislação brasileira. Também foram produzidos sucos adulterados com quantidade de açúcar de cana acima do limite mínimo permitido pelo MAPA. Na análise isotópica, foi mensurado o enriquecimento isotópico relativo dos sucos e das polpas de caju, e também das suas frações – sólidos insolúveis e açúcar purificado. Com esses resultados, foi estimada a quantidade de fonte C_3 por meio da equação da diluição isotópica. Para determinar a existência de adulteração, foi calculado o limite de legalidade de acordo com a legislação brasileira. Sete produtos comerciais de caju (suco e polpa) foram analisados. Quatro deles não estavam em acordo com as normas do MAPA. A metodologia de análise isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), baseada nos metabolismos fotossintéticos C_3 e C_4 , mensurou com eficiência a quantidade de fonte C_3 dos sucos e das polpas de caju comerciais. O limite de legalidade possibilitou identificar as bebidas que estavam em desacordo com a legislação brasileira.

Palavras-chave: Qualidade; Limite de legalidade; Carbono-13; IRMS; *Anacordium occidentale*.

Summary

The aims of this work were to use the isotope analysis method to quantify the carbon of the C_3 photosynthetic cycle in commercial cashew pulp and its reconstituted juice, and measure the legal limit based on Brazilian legislation in order to identify beverages that do not conform to the norms of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). The juices were produced in a laboratory according to Brazilian law. Adulterated juices were also produced with a quantity of cane sugar above the limit permitted by MAPA. The isotopic analyses measured the relative isotope enrichment of the cashew juices and pulps and of their fractions - purified sugar and insoluble solids. The quantity of C_3 source was estimated from these results using the isotope dilution equation. To determine the existence of adulteration it was necessary to create a legal limit according to Brazilian law. Seven commercial cashew products (juice and pulp) were analyzed and four were not in agreement with the MAPA norms. The carbon isotope analysis methodology ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) based on the C_3 and C_4 photosynthetic metabolisms efficiently measured the C_3 source concentration in commercial cashew juices and pulps. The legal limit enabled the identification of beverages not conforming with Brazilian law.

Key words: Quality; Legal limit; Carbon-13; IRMS; *Anacordium occidentale*.

Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju

FIGUEIRA, R. et al.

1 Introdução

A adulteração de sucos e polpas de frutas ocorre pela adição de açúcar de cana. Para identificar essa adulteração, a análise isotópica é a mais sofisticada e específica técnica, sendo amplamente usada na área de alimentos e bebidas (REID et al., 2006). A técnica dos isótopos estáveis tem sido utilizada rotineiramente no controle de qualidade dos processos industriais de produção de bebidas e nas instituições oficiais de fiscalização como instrumento de autuação de produtos fraudados (KELLY, 2003).

A metodologia da razão isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) baseia-se na mistura de compostos produzidos a partir de plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 (laranja, uva, maçã, pêssego, etc.) e C_4 (cana-de-açúcar, milho, sorgo, etc.). Os vegetais C_3 apresentam valores de enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) entre $-22,00$ e $-4,00$ *per mil* (‰). Nos vegetais C_4 , o $\delta^{13}\text{C}$ varia de $-9,00$ a $-16,00$ ‰ (KOZIET et al., 1993; ROSSMANN, 2001). Essa diferença entre plantas C_3 e C_4 também é encontrada nos seus produtos e derivados, podendo determinar com precisão a origem botânica do carbono (ROSSMANN, 2001).

A maioria das técnicas isotópicas requer a utilização de banco de dados oriundo de valores isotópicos das matérias-primas (suco de fruta e açúcar) como referência de comparação, para estimar a composição dos produtos a serem analisados. Porém, a utilização de um componente interno como referência isotópica diminui erros de quantificação em função da variabilidade isotópica das matérias-primas (KELLY, 2003). Para o suco e a polpa de caju, os sólidos insolúveis podem ser utilizados como padrão interno. O açúcar não apresenta constituinte como referência interna. Por isso, há a necessidade de adotar um valor isotópico fixo oriundo de um banco de dados de diversos tipos de açúcares (DONER, 1995).

O controle da qualidade das bebidas não alcoólicas fabricadas no Brasil é realizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O MAPA define suco de caju integral como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale*), por meio de processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

Suco reconstituído é o suco obtido pela diluição de suco concentrado ou desidratado até a concentração original do suco integral (BRASIL, 2009). Ao suco, poderá ser adicionado açúcar na quantidade máxima de 10% em peso, calculado em gramas de açúcar por 100 g de suco (BRASIL, 2009).

Polpa de caju é o produto não fermentado e não diluído, obtido da parte comestível do pedúnculo do caju,

por meio de processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

O Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do suco e da polpa de caju estabelece que o teor de sólidos solúveis deve ser maior ou igual a 10 °Brix (BRASIL, 2000).

Os objetivos deste trabalho foram utilizar o método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético C_3 em suco reconstituído e polpa de caju comerciais e mensurar o limite de legalidade, baseado na legislação brasileira, para identificar os produtos que não estão em conformidade com o MAPA.

2 Material e Métodos

A razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e do padrão internacional Pee Dee Belemnite (PDB) foi obtida no Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS) (Delta S Finnigan Mat). O valor do enriquecimento isotópico relativo do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) foi calculado pela Equação 1 (DUCATTI, 2005).

$$\delta^{13}\text{C}(\text{Sample, PDB}) = \left[\frac{(R_{\text{Sample}} - R_{\text{Standard}})}{R_{\text{Standard}}} \right] * 10^3 \quad (1)$$

os símbolos da Equação 1 significam: $\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento isotópico relativo da amostra em relação ao padrão PDB (adimensional); R = razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e do padrão (adimensional) (DUCATTI, 2005).

Nos sucos reconstituídos e nas polpas de caju, foram analisados os isótopos estáveis do elemento químico carbono (^{13}C e ^{12}C) para quantificar a proporção de fonte C_3 em cada um desses produtos. Essa mensuração foi obtida pelas Equações 2 e 3, sendo que o valor do enriquecimento isotópico relativo do produto relaciona-se à proporção de carbono C_3 de cada suco e polpa (DUCATTI, 2005).

$$\delta a * A + \delta b * B = \delta p \quad (2)$$

$$A + B = 1 \quad (3)$$

os símbolos das Equações 2 e 3 significam: δa , δb e δp = enriquecimento isotópico relativo da fonte de carbono C_3 , C_4 e produto, respectivamente (adimensional); A e B = proporção relativa da fonte C_3 e C_4 no produto, respectivamente (adimensional) (DUCATTI, 2005).

Três amostras de suco concentrado de caju e cinco tipos de aditivos (ácido cítrico, metabissulfito de sódio, benzoato de sódio, goma xantana e aroma natural de caju) foram fornecidos por indústrias brasileiras de bebidas de caju. Vinte e oito amostras de açúcar de cana (cristal, refinado e líquido) foram doadas por usinas sucroalcooleiras. Os produtos comerciais (quatro marcas de suco reconstituído e três de polpa) foram comprados (em triplicata) em supermercados da região de Botucatu-SP. Todos os produtos foram obtidos no primeiro trimestre de 2010.

Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju

FIGUEIRA, R. et al.

2.1 Produção dos sucos reconstituídos de caju em laboratório

Utilizando-se suco concentrado de caju, açúcar de cana e água, foram produzidos, em duplicata, sucos reconstituídos com concentração de sólidos solúveis inicial em 10 °Brix (BRASIL, 2000). Em seguida, foram adicionadas quantidades crescentes de 0; 2,5; 5,0 até 20,0% de açúcar de cana (m.m^{-1}), conforme o balanço de massa de sólidos solúveis (Equação 4).

$$^{\circ}\text{Brix}_{\text{Suco}} * M_{\text{Suco}} + ^{\circ}\text{Brix}_{\text{Açúcar}} * M_{\text{Açúcar}} = ^{\circ}\text{Brix}_{\text{SucoAdoçado}} * M_{\text{SucoAdoçado}} \quad (4)$$

Os símbolos da Equação 4 significam: °Brix = teor de sólidos solúveis do suco reconstituído (10 °Brix), do açúcar de cana (100 °Brix) e do suco reconstituído adoçado; M = massa do suco reconstituído, do açúcar e do suco reconstituído adoçado.

A quantidade teórica de fonte C_3 ($\% \text{C}_3$) dos sucos reconstituídos foi calculada pela Equação 5. As Equações 4 e 5 foram desenvolvidas a partir do teor de sólidos solúveis citado por Figueira et al. (2010).

$$\% \text{C}_3 = \frac{^{\circ}\text{Brix}_{\text{Suco}} * M_{\text{Suco}}}{^{\circ}\text{Brix}_{\text{Suco}} * M_{\text{Suco}} + ^{\circ}\text{Brix}_{\text{Açúcar}} * M_{\text{Açúcar}}} * 100 \quad (5)$$

2.2 Análise isotópica dos sucos reconstituídos fabricados em laboratório, dos sucos e polpas comerciais e de suas frações (açúcar purificado e sólidos insolúveis)

Em duplicata, as amostras fabricadas em laboratório e os produtos comerciais foram acondicionados em cápsula de estanho (0,35 μL para amostras líquidas ou 0,03 mg para amostras sólidas), empacotados e colocados no Analisador Elemental (EA 1108 - CHN - Fisons Elemental Analyzer) para serem queimados a 1020 °C, liberando CO_2 . Esse gás foi comparado com o CO_2 padrão (PDB), para mensurar o enriquecimento isotópico relativo no Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS) (Delta S Finnigan Mat).

Para purificação do açúcar extraído das amostras fabricadas em laboratório e dos produtos comerciais, foi utilizado o método proposto por Koziet et al. (1995). Para a extração dos sólidos insolúveis (padrão interno), foi utilizada a metodologia desenvolvida por Rossmann et al. (1997).

2.3 Análise isotópica do açúcar de cana e dos aditivos utilizados em sucos reconstituídos de caju comerciais

As amostras sólidas de açúcar e aditivos foram moídas em moinho criogênico com nitrogênio líquido (Spex CertiPrep 6750 Freezer/Mill) durante 3 min na temperatura de -196 °C, para obter uma textura fina

($\leq 65 \mu\text{m}$) e homogênea. As amostras líquidas foram diluídas com água deionizada até a concentração de 10 °Brix.

2.4 Definição dos parâmetros de δp na análise isotópica dos sucos de caju fabricados em laboratório

Nos sucos fabricados em laboratório, a análise isotópica foi feita no próprio suco reconstituído (δp) e também nas suas frações – sólidos insolúveis (δa) e açúcar purificado (δp). O valor isotópico do açúcar de cana (δb) foi obtido a partir de banco de dados. Como foram mensurados dois valores isotópicos para δp , obtiveram-se duas combinações para calcular a concentração de fonte C_3 , por meio das Equações 2 e 3.

Para determinar qual a melhor combinação, os resultados práticos (IRMS) foram subtraídos da quantidade teórica de fonte C_3 (Equação 5). Os Erros obtidos ($\% \text{fonte } \text{C}_3 \text{ teórica} - \% \text{fonte } \text{C}_3 \text{ prática}$) foram submetidos à análise de covariância ($\alpha = 0,05$) (Equação 6), utilizando-se o programa "SAS" (ZAR, 1999).

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta x_j + e_{ij} \quad (6)$$

Os símbolos da Equação 6 significam: y_{ij} = Erro observado da combinação i e nível j de x ; α_i = efeito do i -ésimo tratamento; β = parâmetro da regressão linear; x_j = nível da concentração j de suco, e e_{ij} = erro aleatório (ZAR, 1999).

Sendo o valor do teste F significativo ($p < 0,05$), os Erros de cada combinação foram comparados utilizando-se o Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) (ZAR, 1999). Além disso, foram mensurados a média e o desvio padrão dos Erros.

Com base nas análises estatísticas e na média dos Erros, foi verificada qual combinação teve os resultados práticos mais próximos dos resultados teóricos. A combinação escolhida foi utilizada para quantificar a concentração de carbono de fonte C_3 nas etapas seguintes de desenvolvimento do método.

2.5 Comparação da mensuração de fonte C_3 entre sucos reconstituídos de caju fabricados sem e com aditivos

Para estimar a influência dos aditivos na quantificação de fonte C_3 , foram produzidos cinco sucos reconstituídos com aditivos e cinco sem aditivos. Os sucos foram fabricados com concentração de sólidos solúveis de 10 °Brix (BRASIL, 2000). Em seguida, foram adicionados 10% (m.m^{-1}) de açúcar de cana (BRASIL, 2009).

Os aditivos utilizados na produção dos sucos foram o ácido cítrico (0,30 g.100 mL^{-1}), metabissulfito de sódio (0,004 g.100 mL^{-1}), benzoato de sódio (0,05 g.100 mL^{-1}),

Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju

FIGUEIRA, R. et al.

goma xantana ($0,04 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) e aroma natural de caju ($0,03 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$). As quantidades foram informadas pelas indústrias produtoras de bebidas de caju.

As concentrações de fonte C_3 foram calculadas de acordo com o item 2.4 e comparadas estatisticamente utilizando-se o Teste-*t* para amostras pareadas ($\alpha = 0,05$) (ZAR, 1999).

2.6 Definição do valor isotópico para δb , precisão do método e estimativa de erro

Para verificar a precisão do método, os sucos reconstituídos fabricados em laboratório foram analisados como se fossem bebidas comerciais. Para tanto, foram feitas três combinações com os valores de δb .

Em δa , foi utilizado o valor isotópico dos sólidos insolúveis extraídos dos sucos fabricados em laboratório, conforme citado no item 2.4. Em δb , foram utilizados o valor isotópico mais leve, o médio e o mais pesado do açúcar de cana (banco de dados). Para δp , utilizou-se o valor isotópico do suco fabricado em laboratório ou de sua fração, açúcar purificado, conforme citado no item 2.4. Utilizando-se as Equações 2 e 3, os valores isotópicos de δa foram respectivamente combinados com o valor isotópico mais pesado, o valor médio e o mais leve de δb , juntamente com os valores isotópicos de δp , para mensurar as quantificações de fonte C_3 . Os valores dessas três quantificações foram subtraídos dos valores teóricos de fonte C_3 (item 2.1) para estimar o Erro e foram comparados seguindo os tratamentos estatísticos do item 2.4. Além disso, foi calculado o erro total do método (média dos Erros + desvio padrão) para cada combinação.

Ao ser definida a melhor combinação, o valor isotópico de δb foi utilizado para quantificar a porcentagem de fonte C_3 nos sucos e nas polpas comerciais. Nesses valores, foi acrescido e subtraído o erro total do método.

2.7 Limite de legalidade para suco reconstituído e polpa de caju comercial

Para saber se os sucos e as polpas comerciais estavam ou não adulterados, foi necessária a criação do limite de legalidade, a fim de identificar as bebidas em conformidade ou inconformidade com as normas da legislação brasileira. O limite de legalidade fornece a concentração mínima de fonte C_3 que um suco ou uma polpa de caju comercial deve apresentar para ser considerado legal, ante a legislação brasileira.

Para os sucos e as polpas comerciais, o limite de legalidade foi definido com base na informação do rótulo quanto à presença ou à ausência de açúcar de cana na fabricação desses produtos.

2.8 Concentração de fonte C_3 e determinação da legalidade em suco reconstituído e polpa de caju comerciais

Para calcular a concentração de fonte C_3 nos sucos reconstituídos e nas polpas de caju comerciais, foi utilizado o valor isotópico dos sólidos insolúveis em δa . O valor isotópico de δb foi definido conforme o item 2.6. Para δp , utilizou-se o valor isotópico do produto comercial (suco ou polpa) ou de sua fração açúcar purificado, conforme o item 2.4. Para cada concentração de fonte C_3 , foi inserido, para mais e para menos, o erro total do método (item 2.6). Quando a concentração de fonte C_3 ficou acima ou se sobrepôs ao limite de legalidade, o produto foi considerado em acordo com a legislação brasileira. Quando a concentração ficou abaixo do limite, o produto foi considerado fora dos padrões definidos pelo MAPA.

3 Resultados e Discussão

3.1 Análise isotópica do açúcar de cana e aditivos

Ao ser comparado o valor isotópico dos três tipos de açúcares, houve diferença estatística (Teste de Tukey, $\alpha = 0,05$) entre o valor isotópico do açúcar líquido e o do açúcar refinado. O valor isotópico do açúcar cristal não diferiu dos demais (Tabela 1). Os diferentes processos industriais para a fabricação dos açúcares cristal, refinado e líquido invertido podem ser responsáveis pelo fracionamento isotópico no produto final.

Koziet et al. (1995), analisando a composição isotópica de sucos de frutas e açúcares, encontraram o valor isotópico médio de $-11,23 \pm 0,20\%$ para açúcar de cana. O valor isotópico mais leve foi de $-11,51 \pm 0,01\%$ e o mais pesado de $-10,76 \pm 0,22\%$. Os resultados da Tabela 1 apresentam menor concentração de ^{13}C que os resultados obtidos por Koziet e colaboradores. Segundo Boutton (1996), fatores ambientais (irradiação, umidade do solo, salinidade do solo, etc.) e biológicos (capacidade fotossintética, variação genética, competição, etc.) podem influenciar na composição isotópica de carbono nas plantas C_3 e C_4 .

O valor isotópico do benzoato de sódio ($-29,46 \pm 0,19\%$), do metabissulfito de sódio ($-23,56 \pm 0,17\%$) e do aroma natural de caju

Tabela 1. Enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) dos açúcares de cana. Banco de dados para δb .

Açúcar	n	Média \pm DP (menor/maior) ($\delta\text{‰}$)
Cristal	15	$-12,97 \pm 0,21^{\text{ab1}}$ ($-13,38/-12,67$)
Refinado	8	$-12,87 \pm 0,17^{\text{b}}$ ($-13,16/-12,62$)
Líquido Invertido	5	$-13,21 \pm 0,13^{\text{a}}$ ($-13,36/-13,06$)
Média geral \pm DP		$-12,98 \pm 0,22$

¹Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju

FIGUEIRA, R. et al.

($-29,01 \pm 0,05\%$) foi característico de plantas com metabolismo fotossintético C_3 . Ácido cítrico ($-12,99 \pm 0,12\%$) e goma xantana ($-11,74 \pm 0,09\%$) tiveram valores isotópicos semelhantes a plantas C_4 . Os valores isotópicos do benzoato de sódio e do ácido cítrico corroboram com os obtidos por Figueira (2008). O valor isotópico da goma xantana foi semelhante ao relatado por Nogueira (2008).

3.2 Análise isotópica e definição dos melhores parâmetros de δp para quantificar a participação de fonte C_3 em sucos reconstituídos de caju fabricados em laboratório

O valor isotópico do suco reconstituído fabricado em laboratório e de sua fração açúcar purificado torna-se mais pesado à medida que aumenta a adição de açúcar de cana. O valor isotópico dos sólidos insolúveis (padrão interno) não se altera, permanecendo entre $-26,65$ e $-26,30\%$, independentemente da quantidade de açúcar

de cana (Fonte C_4) adicionada (Tabela 2). A utilização dos sólidos insolúveis como referência isotópica interna permite identificar o valor isotópico da matéria-prima de origem C_3 .

Utilizando-se os dados relativos ao enriquecimento isotópico dos sólidos insolúveis em δa (Tabela 2), do açúcar de cana ($-13,03\%$) em δb , do suco reconstituído fabricado em laboratório ou de sua fração açúcar purificado em δp (Tabela 2), obtiveram-se as quantificações práticas da porcentagem de fonte C_3 (Tabela 3).

Na análise de covariância, os valores do teste F não foram significativos ($p > 0,05$). Portanto, não houve diferença entre as combinações 1 e 2. Como a combinação 1 teve a menor média dos Erros, esta foi indicada para mensurar a quantidade de fonte C_3 em suco reconstituído de caju (Tabela 3). Figueira et al. (2010) verificaram a legalidade de suco de uva comercializado no mercado brasileiro, por meio da análise isotópica. No referido estudo, o melhor resultado para a quantificação

Tabela 2. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 dos sucos reconstituídos fabricados em laboratório (δp) e das frações sólidos insolúveis (δa) e açúcar purificado (δp).

Nº	%Açúcar ¹	δa ($\delta\%$)		δp ($\delta\%$)		δp ($\delta\%$)	
		Sólidos insolúveis	Desvio padrão	Suco	Desvio padrão	Açúcar purificado	Desvio padrão
1	0,0	-26,63	0,05	-26,50	0,07	-26,47	0,07
2	2,5	-26,65	0,02	-23,75	0,03	-23,65	0,04
3	5,0	-26,48	0,00	-21,84	0,02	-22,02	0,05
4	7,5	-26,45	0,02	-20,41	0,08	-20,46	0,12
5	10,0	-26,40	0,04	-19,28	0,16	-19,53	0,08
6	12,5	-26,49	0,03	-18,65	0,12	-18,68	0,04
7	15,0	-26,49	0,00	-18,04	0,05	-17,66	0,05
8	17,5	-26,40	0,01	-17,18	0,09	-17,24	0,07
9	20,0	-26,30	0,01	-16,93	0,02	-16,88	0,05

¹% de açúcar ($-13,03\%$).

Tabela 3. Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C_3 nas combinações realizadas de δp em sucos reconstituídos de caju fabricados em laboratório.

Nº	%Açúcar ¹	%C ₃ teórico	1		2	
			SI x S	Erro (%) ²	SI x AP	Erro (%)
1	0,0	100,00	99,04	0,96	98,82	1,18
2	2,5	79,59	78,74	0,86	78,00	1,59
3	5,0	65,52	65,46	0,05	66,80	1,29
4	7,5	55,22	54,98	0,25	55,35	0,12
5	10,0	47,37	46,76	0,60	48,63	1,27
6	12,5	41,18	41,73	0,56	41,95	0,78
7	15,0	36,17	37,24	1,07	34,37	1,80
8	17,5	32,04	31,00	1,04	31,45	0,59
9	20,0	28,57	29,40	0,83	29,02	0,45
Média				0,69 ³		1,01 ^a
Desvio padrão				0,35		0,56

¹% açúcar ($-13,03\%$); ²%fonte C_3 teórico – %fonte C_3 prático; ³Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$); SI versus S – sólidos insolúveis extraído do suco reconstituído fabricado em laboratório (δa) versus suco reconstituído fabricado em laboratório (δp); SI versus AP - sólidos insolúveis extraídos do suco reconstituído fabricado em laboratório (δa) versus açúcar purificado extraído do suco reconstituído fabricado em laboratório (δp).

Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju

FIGUEIRA, R. et al.

de fonte C_3 foi obtido utilizando-se o valor isotópico do suco de uva em δp . Essa observação corrobora com o apresentado na Tabela 3.

3.3 Comparação da mensuração de fonte C_3 entre sucos reconstituídos de caju fabricados sem e com aditivos

A quantificação de fonte C_3 nos sucos reconstituídos fabricados sem e com aditivos foi realizada conforme o item 3.2. Comparando-se os resultados da quantificação de fonte C_3 entre sucos fabricados sem ($47,01 \pm 0,21\%$) e com aditivos ($48,12 \pm 0,12\%$), não foi observada diferença estatística (Teste- t , $\alpha = 0,05$). Tal observação foi relatada por Figueira et al. (2010), que realizaram o mesmo estudo comparativo com sucos de uva fabricados com e sem aditivos.

3.4 Definição do valor isotópico para δb , precisão do método e estimativa de erro

Para verificar a precisão do método, os sucos reconstituídos fabricados em laboratório foram analisados como se fossem bebidas comerciais. Em δa , foram utilizados os valores isotópicos dos sólidos insolúveis extraídos dos sucos (Tabela 2). Para δb (açúcar de cana – Tabela 1), utilizaram-se os valores de $-13,38\%$ (valor isotópico mais leve), $-12,98\%$ (valor médio) e $-12,62\%$ (valor isotópico mais pesado). Em δp , foram usados os valores isotópicos dos sucos reconstituídos fabricados em laboratório (Tabela 2).

Na análise de covariância, os valores do teste F não foram significativos ($p > 0,05$). Portanto, não houve diferença estatística entre as combinações. Como a combinação 2 teve a menor média dos Erros, o valor isotópico de $-12,98\%$ foi escolhido como o valor padrão para δb (açúcar de cana). Esse valor, juntamente com o

erro total do método ($\pm 1,10\%$), foi utilizado para mensurar a quantidade de fonte C_3 nos sucos e nas polpas de caju comerciais (Tabela 4).

3.5 Desenvolvimento do limite de legalidade para sucos reconstituídos e polpas de caju comerciais

Para suco reconstituído de caju, a legislação brasileira permite a adição açúcar de cana na quantidade máxima de 10%, calculado em gramas de açúcar por cem gramas de suco (BRASIL, 2009). Porém, todos os sucos reconstituídos adquiridos para esta pesquisa não informavam a adição de açúcar de cana na fabricação dessa bebida. Portanto, esses sucos são constituídos, predominantemente, com matéria-prima oriunda de fonte C_3 . Nesse caso, o limite de legalidade foi definido em 100% de fonte C_3 .

Segundo informações do MAPA, polpa de caju comercial não deve conter açúcar de cana. Nesse sentido, todas as polpas adquiridas não informavam a adição de açúcar na lista de ingredientes. Portanto, como determinado para suco reconstituído, o limite de legalidade para as polpas de caju foi definido em 100% de fonte C_3 .

3.6 Análise isotópica e determinação da legalidade dos sucos reconstituídos e das polpas de caju comerciais

A análise isotópica dos sucos reconstituídos e das polpas de caju comerciais variou de $-25,98$ a $-26,96\%$ e $-26,52$ a $-27,56\%$, respectivamente. Para a análise isotópica dos sólidos insolúveis, a variação foi de $-27,08$ a $-27,92\%$ para suco reconstituído e $-27,39$ a $-27,76\%$ para polpa (Tabela 5). Não foram

Tabela 4. Quantificação de fonte C_3 em sucos reconstituídos fabricados em laboratório: escolha do melhor valor isotópico para δb e estimativa do erro total do método.

Nº	%Açúcar	%C ₃ teórico	1		2		3	
			-13,38%	Erro (%) ¹	-12,98%	Erro (%)	-12,62%	Erro (%)
1	0,0	100,00	99,02	0,98	99,05	0,95	99,07	0,93
2	2,5	79,59	78,14	1,45	78,78	0,81	79,32	0,27
3	5,0	65,52	64,58	0,94	65,63	0,11	66,52	1,01
4	7,5	55,22	53,77	1,45	55,14	0,08	56,31	1,09
5	10,0	47,37	45,33	2,04	46,96	0,41	48,35	0,98
6	12,5	41,18	40,18	1,00	41,95	0,77	43,45	2,28
7	15,0	36,17	35,52	0,65	37,43	1,26	39,06	2,88
8	17,5	32,04	29,19	2,85	31,30	0,74	33,09	1,05
9	20,0	28,57	27,49	1,08	29,67	1,09	31,52	2,95
		Média		1,38 ^{b2}		0,69 ^a		1,49 ^b
		Desvio padrão		0,68		0,41		0,96
		Erro total (\pm) ⁴		2,07		1,10		2,45

¹fonte C_3 teórico – %fonte C_3 prática; ²Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$); ³Erro Total = média dos erros + desvio padrão.

Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de caju

FIGUEIRA, R. et al.

Tabela 5. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos reconstituídos e polpas de caju comerciais (δp), e na fração sólidos insolúveis (δa).

Nº	Produto	°Brix	δa ($\delta\text{‰}$)		δp ($\delta\text{‰}$)		%Fonte C_3 mínima	%Fonte C_3 máxima
			Sólidos insolúveis	Desvio médio	Suco ou polpa	Desvio médio		
10	S. Reconstituído	10,60	-27,08	0,03	-26,96	0,06	98,08	100,28
11	S. Reconstituído	11,80	-27,92	0,01	-25,98	0,10	85,91	88,11
12	S. Reconstituído	10,70	-27,20	0,02	-26,28	0,01	92,46	94,66
13	S. Reconstituído	11,50	-27,59	0,04	-26,70	0,03	92,84	95,04
14	Polpa	10,80	-27,39	0,14	-27,56	0,02	100,08	102,28
15	Polpa	11,10	-27,76	0,02	-27,62	0,12	97,99	100,19
16	Polpa	10,70	-27,59	0,07	-26,52	0,09	91,54	93,74

encontrados na literatura trabalhos isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$) em bebidas de caju.

Para calcular a concentração de fonte C_3 nos sucos reconstituídos e nas polpas de caju comerciais, foram utilizados os valores isotópicos do suco ou da polpa (δp) e da fração sólidos insolúveis (δa), conforme os resultados obtidos no item 3.2. Em δb (açúcar de cana), utilizou-se o valor isotópico de -12,98‰, de acordo com o item 3.4. Para cada quantificação de fonte C_3 , foi inserido o erro total do método de $\pm 1,10\%$, calculado no item 3.4. Dessa forma, foi verificado que as amostras 10, 14 e 15 seguem as normas brasileiras. As demais amostras (11, 12, 13 e 16) apresentaram a concentração de fonte C_3 abaixo do limite de 100% e, por isso, não estão em acordo com as normas do MAPA (Tabela 5). Essa constatação reforça a necessidade de fiscalização das bebidas não alcoólicas à base de frutas.

Em relação à concentração de sólidos solúveis, todos os produtos de caju estavam em conformidade com os Padrões de Identidade e Qualidade estabelecidos pelo MAPA, que limita a concentração mínima de sólidos solúveis em 10 °Brix (BRASIL, 2000) (Tabela 5). Somente a concentração de sólidos solúveis não foi suficiente para garantir a legalidade dos sucos reconstituídos e das polpas de caju produzidos no Brasil.

4 Conclusões

A metodologia de análise isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), baseada nos metabolismos fotossintéticos C_3 e C_4 , mensurou com eficiência a quantidade de fonte C_3 dos sucos e das polpas de caju comerciais.

O limite de legalidade possibilitou identificar com clareza as bebidas em desacordo com a legislação brasileira.

Agradecimento

Ao CNPq (505031/2008-6) e à FAPESP (2009/51661-1), pelo apoio financeiro.

Referências

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S-I. **Mass Spectrometry of Soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. cap. 2, p. 47-82.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução Normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7777>>. Acesso em: 05 fev. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 5 jun. 2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20271>>. Acesso em: 05 fev. 2010.

DONER, L. W. Application of natural variations in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios to detect adulteration of orange, lemon, and apple juices. In: NAGY, S.; ATTAWAY, J. A.; RHODES, M. E. **Adulteration of Fruit Juice Beverage**. 2. ed. New York: Marcel Decker, 1995. cap. 7, p. 125-138.

DUCATTI, C. **Isótopos Estáveis Ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2005. 205 p. Apostila do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

FIGUEIRA, R. **Análise Isotópica da Variabilidade Natural do Carbono-13 em Suco, Néctar e Refrigerante de Maçã (*Malus domestica*, L.)**. 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

FIGUEIRA, R.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G.; DUCATTI, C.; MISCHAN, M. M. Método de análise isotópica

Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e legalidade em suco e polpa de cajuFIGUEIRA, R. *et al.*

($\delta^{13}\text{C}$) e quantificação da porcentagem de fonte C_3 em sucos de uva comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas. v. 13, n. 2, p. 147-155, 2010. <http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2010130200020>

KELLY, S. D. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In: LEES, M. **Food Authenticity and Traceability**. London: Woodhead, 2003. cap. 7, p. 156-183.

KOZIET, J.; PICHLMAYR, F.; ROSSMANN, A. Carbon, oxygen and hydrogen isotopic intercomparison of fruit and vegetable juices. **International Atomic Energy Agency**, Vienna, p. 75-80, 1995.

KOZIET, J.; ROSSMANN, A.; MARTIN, G. J. Determination of the ^{13}C contents of sugars of fruit and vegetables juices: inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 271, n. 1, p. 31-38, 1993.

NOGUEIRA, A. M. P. **Análise Isotópica da Variabilidade Natural do Carbono-13 e Avaliação Energética em Néctares de Pêssego – *Prunus persica* (L.) Batsch**. 2008. 77 f. Dissertação

(Mestrado em Agronomia - Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 07, p.344-353, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2006.01.006>

ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 3, p. 347-381, 2001. <http://dx.doi.org/10.1081/FRI-100104704>

ROSSMANN, A.; KOZIET, J.; MARTIN, G. J.; DENNIS, M. J. Determination of the carbon-13 content of sugars and pulp from fruit juices by isotope-ratio mass spectrometry (internal reference method) a European interlaboratory comparison. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 340, n. 1-3, p. 21-29, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80548-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(93)80548-Y)

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663 p.