

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

### *Isotopic analysis ( $\delta^{13}\text{C}$ ) method and legal limit in orange nectar*

#### 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

Universidade Estadual Paulista (UNESP)  
Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA)  
Laboratório de Bebidas  
e-mail: andressa\_nogueira@fca.unesp.br

##### Carlos DUCATTI

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

##### Waldemar Gastoni VENTURINI FILHO

Universidade Estadual Paulista (UNESP)  
Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA)  
Laboratório de Bebidas  
e-mail: venturini@fca.unesp.br

##### Martha Maria MISCHAN

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

##### Evandro Tadeu da SILVA

Universidade Estadual Paulista (UNESP)  
Instituto de Biociências (IB)  
Centro de Isótopos Estáveis Ambientais  
e-mail: evandro@ibb.unesp.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 06/05/2010  
Aprovado | Approved: 13/04/2011

#### Resumo

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver o método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  em néctares de laranja comerciais e mensurar o limite de legalidade, baseado na legislação brasileira, para identificar as bebidas que não estão em conformidade com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). As bebidas foram produzidas em laboratório, conforme a legislação brasileira. Também foram produzidos néctares adulterados com quantidade de suco de laranja abaixo do limite mínimo permitido pelo MAPA. Na análise isotópica, foi mensurado o enriquecimento isotópico relativo dos néctares de laranja e também de suas frações, sólidos insolúveis (polpa) e açúcar purificado. Com esses resultados, foi estimada a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  por meio da equação da diluição isotópica. Para determinar a existência de adulteração, foi necessária a criação do limite de legalidade de acordo com a legislação brasileira. Oito marcas comerciais de néctar de laranja foram analisadas. Todas foram classificadas como legais. O limite de legalidade foi uma importante inovação metodológica, que possibilitou identificar as bebidas que estavam em conformidade com a legislação brasileira. A metodologia desenvolvida provou ser eficiente para quantificar o carbono de origem  $\text{C}_3$  em néctares de laranja comerciais.

**Palavras-chave:** Adulteração; Qualidade; Limite de legalidade; Carbono-13; IRMS; *Citrus sinensis*.

#### Summary

This work aimed to develop the isotope analysis method to quantify the carbon of the  $\text{C}_3$  photosynthetic cycle in commercial orange nectars, and to measure the legal limit based on Brazilian legislation in order to identify beverages not conforming to the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). The beverages were produced in a laboratory according to Brazilian law. Adulterated nectars were also produced with a pulpy juice quantity below the level permitted by MAPA. Isotope analyses measured the relative isotope enrichment of the orange nectars and also of their fractions, the purified sugar and the insoluble solids (pulp). From these results the  $\text{C}_3$  source concentration was estimated using the isotope dilution equation. To determine the existence of adulteration in commercial nectars, a legal limit had to be created according to Brazilian law. Eight commercial nectar brands were analyzed. All were classified as legal. The legal limit was an important methodological innovation that enabled the identification of beverages not conforming to Brazilian law. The methodology developed proved efficient in quantifying the carbon of  $\text{C}_3$  origin in commercial orange nectars.

**Key words:** Adulteration; Quality; Legal limit; Carbon-13; IRMS; *Citrus sinensis*.

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

FIGUEIRA, R. et al.

### 1 Introdução

Em um mercado altamente competitivo, as indústrias de bebidas apostam na diversificação da linha de produtos. O néctar de fruta é uma bebida que vem ganhando espaço entre os consumidores (QUEIROZ e MENEZES, 2005). Seu principal atrativo é o preço mais baixo em relação aos sucos integrais. Isso ocorre porque os néctares possuem menor teor de suco de fruta na sua composição e o suco da fruta é o ingrediente mais caro na elaboração do néctar.

A adulteração nos néctares ocorre pela adição de suco de fruta abaixo dos valores mínimos fixados em legislação específica. 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  $\text{C}_3$  (laranja, uva, maçã, pêssego, etc.) e  $\text{C}_4$  (cana-de-açúcar, milho, sorgo, etc.). Os vegetais  $\text{C}_3$  apresentam valores de enriquecimento isotópico relativo ( $\delta^{13}\text{C}$ ) entre  $-22,00$  a  $-34,00$  per mil (‰). Nos vegetais  $\text{C}_4$ , o  $\delta^{13}\text{C}$  varia de  $-9,00$  a  $-16,00$ ‰ (KOZIET et al., 1993; ROSSMANN, 2001). Essa diferença entre plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  também é encontrada nos seus produtos e derivados, podendo-se, assim, determinar com precisão qual 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, o banco de dados pode ser substituído pela análise isotópica de um padrão interno. 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 néctar de laranja, seus sólidos insolúveis (polpa) podem ser utilizados como padrão interno. O açúcar não apresenta constituinte como referência interna. Por isso, há a necessidade de se 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 laranja como a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da laranja (*Citrus sinensis*) por meio de processo tecnológico

adequado (BRASIL, 2009). De acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ), o teor de sólidos solúveis do suco de laranja deve ser maior ou igual a 10,5 °Brix (BRASIL, 2000).

Néctar é a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal ou de seu extrato, adicionada de açúcares, destinada ao consumo direto (BRASIL, 2009). A legislação brasileira não determina o PIQ para néctar de laranja. Neste caso, o néctar, cuja quantidade mínima de polpa ou suco de uma determinada fruta não tenha sido fixada em Regulamento Técnico específico, deve conter, no mínimo, 30% (m/m) da respectiva polpa, ressalvado o caso de fruta com acidez ou conteúdo de polpa (sólidos insolúveis) muito elevado ou sabor muito forte; neste caso, o conteúdo de polpa não deve ser inferior a 20% (m/m) (BRASIL, 2003).

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver o método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  em néctares de laranja comerciais e mensurar o limite de legalidade, baseado na legislação brasileira, para identificar as bebidas que não estão em conformidade com o MAPA.

### 2 Material e métodos

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

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

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 néctares de laranja, utilizaram-se os isótopos estáveis do elemento químico carbono ( $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$ ) para quantificar a participação da fonte  $\text{C}_3$ . Essa mensuração foi obtida pelas Equações 2 e 3, cujo valor do enriquecimento isotópico relativo do produto refletirá a proporção de carbono-13 de cada fonte (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:  $\delta a$ ,  $\delta b$  e  $\delta p$  = enriquecimento isotópico relativo da fonte de carbono  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  e do produto, respectivamente (adimensional); A e B = proporção relativa da fonte  $\text{C}_3$  e

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

FIGUEIRA, R. et al.

$C_4$  no produto, respectivamente (adimensional) (DUCATTI, 2005).

As matérias-primas foram fornecidas por indústrias brasileiras de bebidas de laranja. Foram cedidas quatro amostras de suco concentrado de laranja, doze amostras de açúcar de cana (cristal, refinado e líquido invertido) e três tipos de aditivos (ácido cítrico, ácido ascórbico e aroma idêntico ao natural de laranja). Oito marcas de néctares comerciais foram compradas, em duplicata, no quarto trimestre de 2009, em supermercados da região de Botucatu-SP.

### 2.1 Produção dos néctares de laranja em laboratório

Utilizando-se suco concentrado de laranja, açúcar de cana e água, foram produzidos, em duplicata, néctares de laranja conforme a legislação brasileira. Também foram fabricados néctares com quantidade de suco abaixo do estabelecido pelo MAPA. Os néctares de laranja foram fabricados com concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix (valor médio encontrado nos produtos comerciais). Essas bebidas foram produzidas com 20, 25 até 50% (m/m) de suco reconstituído a 10,5 °Brix (BRASIL, 2000), conforme o balanço de massa de sólidos solúveis (Equação 4).

$$\begin{aligned} &^{\circ}\text{Brix}_{\text{Suco}} * M_{\text{Suco}} + ^{\circ}\text{Brix}_{\text{Açúcar}} * M_{\text{Açúcar}} + \\ &^{\circ}\text{Brix}_{\text{Água}} * M_{\text{Água}} = ^{\circ}\text{Brix}_{\text{Néctar}} * M_{\text{Néctar}} \end{aligned} \quad (4)$$

Os símbolos da Equação 4 significam: °Brix = teor de sólidos solúveis do suco reconstituído, açúcar de cana (100 °Brix), água (0°Brix) e néctar;  $M$  = massa do suco reconstituído, açúcar, água e néctar.

A quantidade teórica de fonte  $C_3$  ( $\%C_3$ ) dos néctares 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).

$$\%C_3 = \frac{^{\circ}\text{Brix}_{\text{Suco}} * M_{\text{Suco}}}{^{\circ}\text{Brix}_{\text{Suco}} * M_{\text{Suco}} + ^{\circ}\text{Brix}_{\text{Açúcar}} * M_{\text{Açúcar}}} * 100 \quad (5)$$

### 2.2 Análise isotópica dos sucos concentrados, dos néctares fabricados em laboratório e dos néctares comerciais de laranja

Para a análise isotópica dos produtos de laranja, realizada em duplicata, 0,35 microlitro ( $\mu\text{L}$ ) foi acondicionado em cápsula de estanho, empacotada e colocada no Analisador Elementar (EA 1108 – CHN – Fisons Elemental Analyzer) para ser queimada a 1020 °C, liberando  $\text{CO}_2$ . Este gás foi comparado com o  $\text{CO}_2$  padrão (PDB) para mensurar o enriquecimento isotópico relativo no Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS) (Delta S Finnigan Mat).

### 2.3 Análise isotópica do açúcar purificado extraído dos sucos concentrados, dos néctares fabricados em laboratório e dos néctares comerciais de laranja

Para a purificação do açúcar extraído dos produtos de laranja, foi utilizado o método proposto por Koziat et al.(1995). A solução de açúcar purificado (açúcar  $C_3$  + açúcar  $C_4$ ) obtida no final do procedimento foi acondicionada em cápsula de estanho e colocada no Analisador Elementar.

### 2.4 Análise isotópica dos sólidos insolúveis extraídos dos sucos concentrados, dos néctares fabricados em laboratório e dos néctares comerciais de laranja

Para a extração dos sólidos insolúveis (polpa – padrão interno), foi utilizada a metodologia proposta por Rossmann et al.(1997). Após este procedimento, as amostras foram preparadas e colocadas no Analisador Elementar.

### 2.5 Análise isotópica do açúcar de cana e dos aditivos utilizados em néctares comerciais de laranja

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. As amostras sólidas (0,03 mg) e as líquidas (0,35  $\mu\text{L}$ ) foram colocadas em cápsulas de estanho e inseridas no Analisador Elementar.

### 2.6 Definição dos parâmetros de $\delta p$ na análise isotópica dos néctares de laranja fabricados em laboratório

Nos néctares fabricados em laboratório, a análise isotópica foi feita no próprio néctar ( $\delta p$ ) e também nas suas frações, sólidos insolúveis ( $\delta a$ ) e açúcar purificado ( $\delta b$ ). O valor isotópico do açúcar de cana ( $\delta b$ ) foi obtido a partir de banco de dados. Como foram mensurados dois valores isotópicos para  $\delta p$ , obtiveram-se duas combinações para calcular a concentração de fonte  $C_3$  de forma prática, 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 (|quantidade de fonte  $C_3$  teórica – quantidade de fonte  $C_3$  prática|) foram submetidos à análise de covariância ( $\alpha = 0,05$ ), utilizando o programa "SAS", conforme a Equação 6 (ZAR, 1999).

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

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

FIGUEIRA, R. et al.

Os símbolos da Equação 6 significam:  $y_{ij}$  = *Erro* observado da combinação  $i$  e nível  $j$  de  $x$ ;  $\alpha_1$  = efeito do  $i$ -ésimo tratamento;  $\beta$  = 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 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 em qual combinação houve os resultados práticos mais próximos dos resultados teóricos. A combinação escolhida foi utilizada para quantificar a concentração de carbono de fonte  $C_3$  nas próximas etapas de desenvolvimento do método.

### 2.7 Comparação da mensuração de fonte $C_3$ entre néctares de laranja fabricados sem aditivos e néctares de laranja fabricados com aditivos

Para estimar a influência dos aditivos na quantificação de fonte  $C_3$ , foram produzidos cinco néctares de laranja com aditivos e cinco sem aditivos. Os néctares foram fabricados com concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix. Estes néctares foram produzidos com 30% (m/m) (BRASIL, 2003) de suco reconstituído a 10,5 °Brix (BRASIL, 2000). As quantidades de fonte  $C_3$  foram calculadas de acordo com o item 2.6 e comparadas estatisticamente utilizando o Teste  $t$  para amostras pareadas ( $\alpha = 0,05$ ) (ZAR, 1999).

Os aditivos utilizados na produção dos néctares foram o ácido cítrico (0,30 g.100 mL<sup>-1</sup>), o ácido ascórbico (0,05 g.100 mL<sup>-1</sup>) e o aroma idêntico ao natural de laranja (0,04 g.100 mL<sup>-1</sup>). As quantidades foram informadas pelas indústrias produtoras de bebidas de laranja.

### 2.8 Definição do valor isotópico para $\delta b$ , precisão do método e estimativa de erro

Para verificar a precisão do método, os néctares fabricados em laboratório foram analisados como se fossem bebidas comerciais. Para tanto, foram feitas três combinações com os valores de  $\delta b$ .

Em  $\delta a$ , foi utilizado o valor isotópico dos sólidos insolúveis extraídos dos néctares fabricados em laboratório, conforme citado no item 2.6. Em  $\delta b$ , foram utilizados o valor isotópico mais leve, o médio e o mais pesado dos açúcares de cana. Para  $\delta p$ , utilizou-se o valor isotópico do néctar fabricado em laboratório ou de sua fração, açúcar purificado, conforme citado no item 2.6. Utilizando-se as Equações 2 e 3, os valores isotópicos de  $\delta a$  foram respectivamente combinados com o valor isotópico mais pesado, o valor médio e o mais leve de  $\delta b$ , juntamente com os valores isotópicos

de  $\delta p$ , 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 comparados seguindo os tratamentos estatísticos do item 2.6. Além disso, foi calculado o erro total do método (média dos *Erros* + desvio padrão) para cada combinação.

Definida a melhor combinação, o valor isotópico de  $\delta b$  foi utilizado para quantificar a porcentagem de fonte  $C_3$  nos néctares comerciais. Nestes valores, foi acrescido e subtraído o erro total do método.

### 2.9 Limite de legalidade para néctares de laranja comerciais

Para saber se os néctares 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 brasileiras. O limite de legalidade fornece a concentração mínima de fonte  $C_3$  que um néctar de laranja comercial deve apresentar para ser considerado legal, ante a legislação brasileira.

Para néctar de laranja, o limite de legalidade foi obtido pela mensuração teórica da quantidade de fonte  $C_3$  mínima, calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis (Equação 4), em néctares com concentrações de sólidos solúveis em 11; 11,5 até 13 °Brix, adicionados com 30% de suco de laranja a 10,5 °Brix em relação à massa do néctar. Os valores de quantidade mínima de fonte  $C_3$ , calculados pela Equação 5, foram relacionados com as respectivas concentrações de sólidos solúveis (11; 11,5 até 13 °Brix). A curva resultante originou o limite de legalidade.

### 2.10 Concentração de fonte $C_3$ e determinação da legalidade em néctares de laranja comerciais

Para calcular a concentração de fonte  $C_3$  nos néctares de laranja comerciais, foi utilizado o valor isotópico dos sólidos insolúveis em  $\delta a$ . O valor isotópico de  $\delta b$  foi definido conforme o item 2.8. Para  $\delta p$ , utilizou-se o valor isotópico do néctar comercial ou de sua fração açúcar purificado, conforme o item 2.6. Para cada concentração de fonte  $C_3$ , foi inserido, para mais e para menos, o erro total do método (item 2.8). Estes valores foram plotados em gráfico de dispersão e relacionados com os respectivos °Brix. Neste mesmo gráfico, foram inseridos os valores do limite de legalidade. Quando a concentração de fonte  $C_3$  ficou acima ou se sobrepôs à curva do limite de legalidade, o néctar foi considerado legal. Quando a concentração ficou abaixo do limite, o néctar foi considerado adulterado.



## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

FIGUEIRA, R. et al.

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Análise isotópica do açúcar de cana e aditivos

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 apresentados na Tabela 1 foram mais leves que os obtidos pelos autores citados. A diferença dos valores isotópicos entre os dois estudos pode estar relacionada a fatores ambientais (irradiação, umidade do solo, salinidade do solo, etc.) e biológicos (capacidade fotossintética,

variação genética, competição, etc.) que influenciam na composição isotópica de carbono nas plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  (BOUTTON, 1996).

Comparando-se o valor isotópico dos três tipos de açúcares, não houve diferença estatística (Análise de Variância,  $\alpha = 0,05$ ) (Tabela 1).

O valor isotópico do aroma idêntico ao natural de laranja ( $-30,02 \pm 0,14\%$ ) foi característico de plantas com metabolismo fotossintético  $\text{C}_3$ . Ácido ascórbico ( $-12,17 \pm 0,08\%$ ) e ácido cítrico ( $-13,45 \pm 0,16\%$ ) tiveram valores isotópicos semelhantes a plantas  $\text{C}_4$ . Os enriquecimentos isotópicos relativos do ácido ascórbico e do ácido cítrico corroboram com os obtidos por Figueira (2008).

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

Nº	Açúcar	Média ( $\delta\%$ )	Desvio médio
1	Cristal	-13,38	0,12
2	Cristal	-13,20	0,09
3	Cristal	-13,18	0,04
4	Cristal	-13,06	0,13
5	Cristal	-12,83	0,00
6	Cristal	-12,92	0,02
	Média	-13,09a <sup>1</sup>	
	Desvio padrão	0,20	
7	Líquido invertido	-13,30	0,11
8	Líquido invertido	-13,36	0,07
9	Líquido invertido	-13,21	0,04
	Média	-13,29a	
	Desvio padrão	0,08	
10	Refinado	-13,03	0,08
11	Refinado	-13,16	0,04
12	Refinado	-12,77	0,11
	Média	-12,99a	
	Desvio padrão	0,20	
	Média geral	-13,11	
	Desvio padrão	0,20	

<sup>1</sup>Análise de variância ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 3.2 Análise isotópica dos néctares de laranja fabricados em laboratório

O valor isotópico do néctar fabricado em laboratório e de sua fração açúcar purificado torna-se mais leve à medida que aumenta a adição de suco de laranja (Tabela 2). O valor isotópico dos sólidos insolúveis (padrão interno) permanece entre  $-26,56$  a  $-26,83\%$ , independentemente da quantidade de suco (Fonte  $\text{C}_3$ ) ou do açúcar de cana (Fonte  $\text{C}_4$ ) adicionado (Tabela 2). A utilização dos sólidos insolúveis como referência isotópica interna permite identificar o valor isotópico da matéria-prima de origem  $\text{C}_3$ .

#### 3.3 Definição dos melhores parâmetros de $\delta\text{p}$ para quantificar a participação de fonte $\text{C}_3$ em néctares de laranja fabricados em laboratório

Utilizando-se o enriquecimento isotópico dos sólidos insolúveis em da (Tabela 2), do açúcar de cana (amostra 11 – Tabela 1) em  $\delta\text{b}$ , do néctar fabricado em laboratório ou de sua fração açúcar purificado em  $\delta\text{p}$  (Tabela 2), obtiveram-se as quantificações práticas da porcentagem de fonte  $\text{C}_3$  (Tabela 3).

**Tabela 2.** Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 dos néctares fabricados em laboratório ( $\delta\text{p}$ ) e das frações sólidos insolúveis ( $\delta\text{a}$ ) e açúcar purificado ( $\delta\text{p}$ ).

Nº	%Suco <sup>1</sup>	$\delta\text{a}$ ( $\delta\%$ )		$\delta\text{p}$ ( $\delta\%$ )		$\delta\text{p}$ ( $\delta\%$ )	
		Sólidos insolúveis	Desvio padrão	Néctar	Desvio padrão	Açúcar purificado	Desvio padrão
13	20	-26,62	0,04	-15,67	0,07	-15,49	0,13
14	25	-26,56	0,03	-16,30	0,02	-16,13	0,13
15	30	-26,58	0,06	-16,83	0,04	-16,34	0,03
16	35	-26,61	0,04	-17,40	0,10	-16,91	0,07
17	40	-26,83	0,09	-17,93	0,11	-17,15	0,13
18	45	-26,71	0,05	-18,52	0,17	-17,86	0,13
19	50	-26,79	0,03	-19,08	0,04	-18,39	0,10

<sup>1</sup>Porcentagem suco reconstituído a 10,5 °Brix (m/m).

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

FIGUEIRA, R. et al.

Na análise de covariância, os valores do teste  $F$  foram significativos ( $p < 0,0177$ ). O teste de Tukey encontrou diferença estatística 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 néctares de laranja (Tabela 3).

Queiroz et al.(2007) verificaram a legalidade de bebidas de laranja comercializadas no mercado brasileiro, por meio da análise isotópica. Nesse estudo, o melhor resultado para a quantificação de fonte  $C_3$  foi obtido utilizando o valor isotópico do açúcar purificado em  $\delta_p$ . Esta conclusão difere do resultado encontrado nesta pesquisa. Queiroz e colaboradores desenvolveram o método isotópico baseado no suco de laranja e, a partir disso, extrapolaram os resultados para néctares de laranja. Portanto, o método isotópico desenvolvido no trabalho de referência não é específico para néctar de laranja. Além disso, os autores utilizaram uma equação, derivada das Equações 2 e 3, que emprega fatores de correção baseados na concentração dos Açúcares Redutores Totais em relação à de sólidos solúveis das bebidas de laranja (ART/°Brix). Estas variações metodológicas contribuíram para determinar outra forma de cálculo para a concentração de fonte  $C_3$  em néctares de laranja.

### 3.4 Comparação da mensuração de fonte $C_3$ entre néctares de laranja fabricados sem aditivos e néctares fabricados com aditivos

A quantificação de fonte  $C_3$  nos sucos fabricados sem e com aditivos foi realizada conforme o item 3.3. Comparando-se os resultados da quantificação de fonte  $C_3$  entre néctares fabricados sem ( $27,66 \pm 0,31\%$ ) e com aditivos ( $28,05 \pm 0,32\%$ ), não foi observada diferença estatística (Teste  $t$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Esta observação foi relatada por Figueira (2008) e Nogueira (2008), os quais realizaram

o mesmo estudo comparativo com néctares de maçã e pêssego, respectivamente.

### 3.5 Definição do valor isotópico para $\delta_b$ , precisão do método e estimativa de erro

Para calcular as concentrações de fonte  $C_3$  nos néctares fabricados em laboratório, em da foram utilizados os valores isotópicos dos sólidos insolúveis extraídos dos néctares (Tabela 2). Para  $\delta_b$  (açúcar de cana – Tabela 1), utilizaram-se os valores de  $-13,38\%$  (amostra 1 – valor isotópico mais leve),  $-13,11\%$  (valor médio) e  $-12,77\%$  (amostra 12 – valor isotópico mais pesado). Em  $\delta_p$ , foram usados os valores isotópicos dos néctares fabricados em laboratório (Tabela 2).

Na análise de covariância, os valores do teste  $F$  foram significativos ( $p < 0,0001$ ). O teste de Tukey não identificou diferença estatística entre as combinações 1 e 2. Porém, a combinação 3 diferiu das demais. Como a combinação 1 teve a menor média dos *Erros*, o valor isotópico de  $-13,38\%$  foi escolhido como o valor padrão para  $\delta_b$  (açúcar de cana). Este valor, juntamente com o erro total ( $\pm 1,08\%$ ), foram utilizados para mensurar a quantidade de fonte  $C_3$  nos néctares de laranja comerciais (Tabela 4).

### 3.6 Desenvolvimento do limite de legalidade para néctares de laranja comerciais

Para néctares de laranja, o limite de legalidade foi obtido conforme o balanço de massa da Tabela 5.

### 3.7 Análise isotópica e determinação da legalidade dos néctares de laranja comerciais

O enriquecimento isotópico relativo nos néctares de laranja comerciais variou de  $-17,51$  a  $20,75\%$ . Na análise dos sólidos insolúveis, a amplitude dos resultados foi de  $-25,41$  a  $-27,62\%$  (Tabela 6). Queiroz et al.(2009),

**Tabela 3.** Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte  $C_3$  nas combinações realizadas de  $\delta_p$  em néctares de laranja fabricados em laboratório.

N°	%Suco <sup>1</sup>	%C <sub>3</sub> Teórico	1		2	
			$\delta_{SI} \times \delta_N$	Erro (%) <sup>2</sup>	$\delta_{SI} \times \delta_{AP}$	Erro (%)
13	20	17,50	18,68	1,18	17,29	0,21
14	25	21,88	23,39	1,51	22,18	0,31
15	30	26,25	27,33	1,08	23,70	2,55
16	35	30,63	31,52	0,89	27,87	2,75
17	40	35,00	34,86	0,14	29,18	5,82
18	45	39,38	39,53	0,16	34,69	4,69
19	50	43,75	43,43	0,32	38,35	5,40
		Média		0,75b <sup>3</sup>		3,10a
		Desvio padrão		0,55		2,30

<sup>1</sup>Porcentagem suco reconstituído a 10,5 °Brix (m/m); <sup>2</sup>Porcentagem fonte  $C_3$  teórico – Porcentagem fonte  $C_3$  prático; <sup>3</sup>Teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ );  $\delta_{SI}$  versus  $\delta_N$  – sólidos insolúveis extraídos do néctar fabricado em laboratório ( $\delta_a$ ) versus néctar fabricado em laboratório ( $\delta_p$ );  $\delta_{SI}$  versus  $\delta_{AP}$  – sólidos insolúveis extraídos do néctar fabricado em laboratório ( $\delta_a$ ) versus açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório ( $\delta_p$ ).

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

FIGUEIRA, R. et al.

**Tabela 4.** Quantificação de fonte  $\text{C}_3$  em néctares de laranja fabricados em laboratório: escolha do melhor valor isotópico para  $\delta\text{b}$  e estimativa de erro.

N°	%Suco <sup>1</sup>	%C <sub>3</sub> Teórico	1		2		3	
			-13,38‰ ( $\delta\text{b}$ )	Erro (%) <sup>2</sup>	-13,11‰ ( $\delta\text{b}$ )	Erro (%)	-12,77‰ ( $\delta\text{b}$ )	Erro (%)
13	20	17,50	17,33	0,17	18,98	1,48	20,97	3,47
14	25	21,88	22,11	0,24	23,67	1,80	25,56	3,68
15	30	26,25	26,12	0,13	27,60	1,35	29,38	3,13
16	35	30,63	30,38	0,25	31,77	1,14	33,45	2,82
17	40	35,00	33,80	1,20	35,10	0,10	36,67	1,67
18	45	39,38	38,53	0,84	39,75	0,38	41,22	1,85
19	50	43,75	42,51	1,24	43,64	0,11	45,01	1,26
Média				0,58b <sup>3</sup>	0,91b		2,55a	
Desvio padrão				0,50	0,70		0,96	
Erro total ( $\pm$ ) <sup>4</sup>				1,08	1,61		3,51	

<sup>1</sup>Porcentagem suco reconstituído a 10,5 °Brix (m/m); <sup>2</sup>Porcentagem fonte  $\text{C}_3$  teórico - %fonte  $\text{C}_3$  prático; <sup>3</sup>Teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ); <sup>4</sup>Erro Total = média dos erros + desvio padrão.

**Tabela 5.** Balanço de massa para néctares de laranja adicionados com 30% de suco de laranja a 10,5 °Brix em relação à massa do néctar.

N°	Suco reconstituído			Açúcar		Água		Néctar		Limite de legalidade (%fonte $\text{C}_3$ )
	°Brix	%Adicionado	g	°Brix	g	°Brix	g	°Brix	g	
20	10,5	30	75	100	19,63	0	155,38	11,0	250	28,64
21	10,5	30	75	100	20,88	0	154,13	11,5	250	27,39
22	10,5	30	75	100	22,13	0	152,88	12,0	250	26,25
23	10,5	30	75	100	23,38	0	151,63	12,5	250	25,20
24	10,5	30	75	100	24,63	0	150,38	13,0	250	24,23

**Tabela 6.** Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em néctares de laranja comerciais ( $\delta\text{p}$ ) e da fração sólidos insolúveis ( $\delta\text{a}$ ).

N°	°Brix	$\delta\text{a}$ (d‰)		$\delta\text{p}$ (‰)	
		Sólidos insolúveis	Desvio médio	Néctar	Desvio médio
30	12,4	-27,62	0,03	-20,75	0,04
31	11,5	-26,43	0,02	-17,94	0,08
32	11,8	-27,14	0,03	-20,07	0,15
33	12,5	-25,41	0,08	-17,51	0,20
34	12,8	-26,58	0,15	-17,80	0,08
35	11,5	-26,91	0,03	-19,21	0,12
36	12,6	-26,52	0,05	-17,95	0,11
37	11,2	-27,36	0,02	-19,05	0,17
Média		-26,74		-18,78	
Desvio padrão		0,69		1,18	

Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

verificando a legalidade de bebidas não alcoólicas à base de laranja comercializados no mercado brasileiro, obteve a variação de -26,45 a -27,47‰ para a análise isotópica da polpa. Os resultados da literatura de referência corroboram com os obtidos nessa pesquisa.

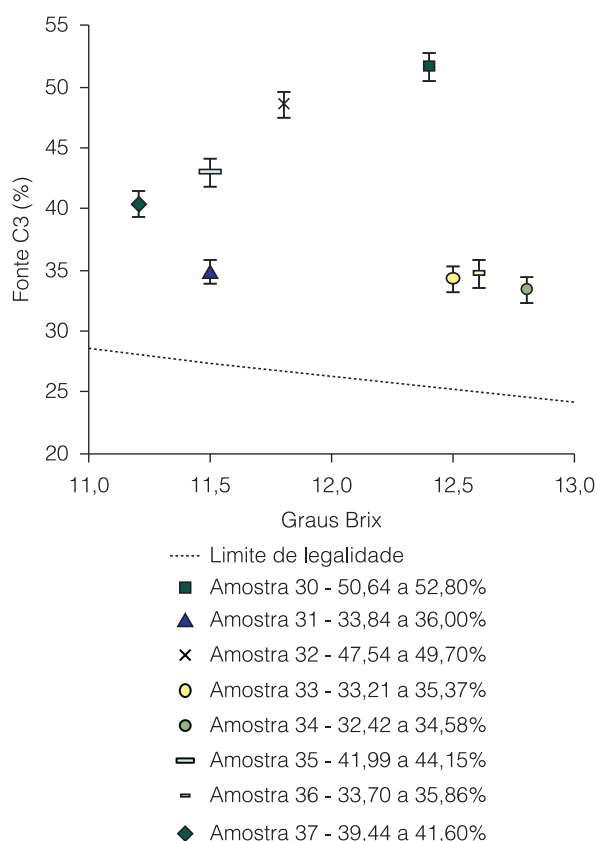
Para calcular a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  nos néctares de laranja comerciais, foram utilizados os valores isotópicos dos néctares comerciais ( $\delta\text{p}$ ) e da fração sólidos insolúveis ( $\delta\text{a}$ ), conforme os resultados obtidos

no item 3.3. Em  $\delta\text{b}$  (açúcar de cana), utilizou-se o valor isotópico de -13,38‰, de acordo com o item 3.5. Para cada quantificação de fonte  $\text{C}_3$ , foi inserido o erro total de  $\pm 1,08\%$ , calculado no item 3.5.

Relacionando as quantidades de fonte  $\text{C}_3$  ao °Brix dos néctares de laranja comerciais, foi verificado que todas as amostras estão acima do limite de legalidade e, portanto, em acordo com as normas do MAPA (Figura 1).

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja

FIGUEIRA, R. et al.



**Figura 1.** Relação entre a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  e o  $^\circ\text{Brix}$  para classificar a legalidade dos néctares de laranja comerciais. Limites de legalidade: amostra 30 = 25,40%; amostra 31 = 27,39%; amostra 32 = 26,69%; amostra 33 = 25,20%; amostra 34 = 24,61%; amostra 35 = 27,39%; amostra 36 = 25,00%; amostra 37 = 28,13%.

## 4 Conclusões

O limite de legalidade foi uma importante inovação metodológica que possibilitou identificar as bebidas que estavam em conformidade com a legislação brasileira.

Das marcas de néctares investigadas neste trabalho, todas respeitam a determinação do MAPA quanto à adição de suco de laranja.

A metodologia de análise isotópica do Carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) baseada nos metabolismos fotossintéticos  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  possibilitou mensurar com eficiência a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  dos néctares de laranja comerciais, permitindo identificar com segurança a legalidade dessas bebidas.

## 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 n. 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. Instrução Normativa n. 12, de 4 de setembro de 2003. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical e néctar. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 set. 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>>. Acesso em: 05 fev. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto n. 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)-Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

FIGUEIRA, R.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W. G. Isotopic analysis method ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in apple-flavoured soft drinks. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 69-74, 2010. <http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2010130100009>

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  $^{13}\text{C}$  contents of sugars of fruit and vegetables juices: inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam,



**Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e limite de legalidade em néctar de laranja**FIGUEIRA, R. *et al.*

v. 271, n. 1, p. 31-38, 1993. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80548-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(93)80548-Y)

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)-Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

QUEIROZ, E. C.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W. G.; SILVA, E. T.; NOJIMOTO, T. Quantificação de açúcar de cana em suco de laranja através de análise isotópica do carbono-13 ( $\delta^{13}\text{C}$ ). **Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 278-284, 2007.

QUEIROZ, E. C.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W. G.; SILVA, E. T.; NOJIMOTO, T. Determinação da razão isotópica  $^{13}\text{C}$  em bebidas comerciais a base de laranja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 4, p. 1085-1094, 2009.

QUEIROZ, E. C.; MENEZES, H. C. Suco de Laranja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.) **Tecnologia de Bebidas:**

**Matéria-Prima, BPF/APPCC, Legislação e Mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 11, p. 221-254.

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. 7, p. 344-353, 2006.

ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, New York, v.17, n. 3, p. 347-381, 2001.

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/S0003-2670\(96\)00538-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00538-7)

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