

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva comerciais

*Isotope analysis ( $\delta^{13}\text{C}$ ) method and quantification of percent  $\text{C}_3$  sources in commercial grape juices*

### Autores | Authors

#### ✉ Ricardo FIGUEIRA

Universidade Estadual Paulista (UNESP)  
Instituto de Biociências (IB)  
Centro de Isótopos Estáveis Ambientais  
Distrito de Rubião Jr., s/nº  
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 Agronômicas  
(FCA)  
Laboratório de Bebidas  
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  
e-mail: ducatti@ibb.unesp.br

#### Martha Maria MISCHAN

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

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 17/12/2009  
Aprovado | Approved: 16/06/2010

### Resumo

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver o método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  em sucos de uva comerciais e mensurar a percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima, baseada na legislação brasileira, para identificar as bebidas que não estavam em conformidade com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os sucos foram produzidos em laboratório conforme a legislação brasileira. Também foram produzidos sucos com quantidade de açúcar de cana acima do estabelecido pelo MAPA. Nas análises isotópicas, foi mensurado o enriquecimento isotópico relativo dos sucos de uva e de sua fração açúcar purificado. A partir desses resultados, foi estimada a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  por meio da equação da diluição isotópica. Para determinar a existência de adulteração nos sucos comerciais, foi necessário calcular a percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima de acordo com a legislação brasileira. Dezesete marcas de sucos foram analisadas e três não estavam em acordo com as determinações do MAPA. A metodologia desenvolvida provou ser eficiente para quantificar o carbono de origem  $\text{C}_3$  em sucos de uva comerciais.

**Palavras-chave:** Qualidade; Adulteração; Bebida de fruta; *Vitis* spp.; IRMS; Carbono-13.

### Summary

The aims of this work were to develop the isotope analysis method to quantify the carbon of the  $\text{C}_3$  photosynthetic cycle in commercial grape juices, and to measure the minimum  $\text{C}_3$  source percentage based on Brazilian legislation, in order to identify beverages that do not conform with the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA/Brazil). The juices were produced in a laboratory according to Brazilian law. Adulterated juices were also produced with a quantity of cane sugar above that established by MAPA. In the isotope analyses, the relative isotopic enrichment of the grape juices and their purified sugar fractions were measured. From these results the amount of  $\text{C}_3$  source was estimated by means of the isotopic dilution equation. To determine the existence of adulteration in commercial juices, the minimum  $\text{C}_3$  source percentage had to be measured according to Brazilian law. Seventeen commercial brands of juice were analyzed and three were not in accordance with MAPA legislation. The methodology developed proved to be efficient in quantifying the carbon of  $\text{C}_3$  origin in commercial grape juices.

**Key words:** Quality; Legislation; Fruit beverage; *Vitis* spp.; IRMS; Carbon-13.

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva comerciais

FIGUEIRA, R. et al.

### 1 Introdução

O mercado de suco de uva cresce 15 a 20% por ano, sendo que os sucos integrais têm incremento ainda maior, ao redor de 40%. Nos últimos cinco anos, a comercialização de suco de uva duplicou, atingindo um crescimento de 117% (GIESTEIRA, 2009). O aumento no consumo de bebidas à base de frutas – dentre as quais, os sucos de uva – ocorreu em virtude da preocupação do consumidor com a saúde, fazendo elevar a procura por bebidas com características nutricionais importantes para a prevenção e o controle de doenças (ESPERANCINI, 2005).

A adulteração em sucos de fruta adoçados é feita por meio da adição de açúcar de cana acima dos limites impostos pela legislação (10% em peso, calculado em g de açúcar/100 g de suco - Brasil, 2009). Em sucos integrais, não é permitida a adição de açúcar (BRASIL, 2009). Para identificar essa adulteração, o método isotópico é citado como a única forma de mensurar a quantidade de açúcar adicionado na fabricação dos sucos à base de frutas (KELLY, 2003; ROSSMANN, 2001).

A metodologia da razão isotópica do carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) é extremamente útil quando a composição da bebida baseia-se na mistura de compostos produzidos a partir de plantas dos ciclos fotossintéticos  $\text{C}_3$  (uva, maçã, laranja, pêssago etc) e  $\text{C}_4$  (cana-de-açúcar, milho, sorgo etc). Os vegetais do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  apresentam valores de enriquecimento isotópico relativo ( $\delta^{13}\text{C}$ ) entre -22,00 e -34,00‰. Nos vegetais do ciclo fotossintético  $\text{C}_4$ , o enriquecimento isotópico relativo varia de -9,00 a -16,00‰ (KOZIET et al., 1993; ROSSMANN, 2001). Essa diferença no enriquecimento relativo 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 como referência de comparação, para estimar a composição dos produtos a serem analisados (KELLY, 2003).

No Brasil, o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ), que preconiza as características físicas, químicas e sensoriais das bebidas à base de fruta, é usado para o controle de sua qualidade, por recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A análise física e química convencional de bebidas à base de frutas, tendo como referência o PIQ definido pelo MAPA, não permite mensurar a quantidade de açúcar de cana adicionado na formulação dos sucos à base de frutas.

O MAPA define suco como a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou de parte do vegetal de

origem (BRASIL, 2009). De acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ), o suco de uva (*Vitis* spp.) comercial não deve ter concentração de sólidos solúveis menor que 14 °Brix (BRASIL, 2000). Ao suco, poderá ser adicionado açúcar na quantidade máxima fixada para cada tipo de suco, através de ato administrativo, observado o percentual máximo de 10% em peso, calculado em g de açúcar/100 g de suco (BRASIL, 2009). A designação “integral” será privativa do suco sem adição de açúcar e na sua concentração natural, sendo vedado o uso de tal designação para o suco reconstituído (BRASIL, 2009).

Suco reconstituído é o suco obtido pela diluição de suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor mínimo de sólidos solúveis estabelecido nos respectivos PIQ para cada tipo de suco integral, sendo obrigatório constar a origem do suco utilizado para sua elaboração, se concentrado ou desidratado, sendo opcional o uso da expressão reconstituído (BRASIL, 2009).

Suco concentrado é o suco parcialmente desidratado. O suco concentrado, quando reconstituído, deverá conservar os teores de sólidos solúveis originais do suco integral ou o teor de sólidos solúveis mínimo estabelecido nos respectivos PIQ (BRASIL, 2009).

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver o método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético  $\text{C}_3$  em sucos de uva comerciais e mensurar a percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima, baseada 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 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) é obtido no Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS). A razão  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  em relação ao padrão internacional Pee Dee Belemnite (PDB) é calculada pela Equação 1, sendo:  $\delta^{13}\text{C}$  = 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).

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

Nos sucos de uva, a participação da fonte  $\text{C}_3$  é obtida pelas Equações 2 e 3, cujo valor do enriquecimento isotópico relativo do produto reflete a proporção de carbono-13 de cada fonte. A simbologia das equações significa:  $\delta a$  e  $\delta b$  = enriquecimento isotópico relativo da fonte de carbono  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ , respectivamente (adimensional);  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  = proporção relativa da fonte  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  no produto, respectivamente (adimensional);  $\delta_{\text{produto}}$  = enriquecimento isotópico relativo do produto (adimensional).

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva comerciais

FIGUEIRA, R. et al.

$$\delta a \cdot \text{C}_3 + \delta b \cdot \text{C}_4 = \delta \text{produto} \quad (2)$$

$$\text{C}_3 + \text{C}_4 = 1 \quad (3)$$

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram fornecidas por indústrias brasileiras de bebidas de uva. Foram cedidas quatro amostras de suco concentrado de uva, doze amostras de açúcar de cana (cristal, líquido invertido e refinado) e três tipos de aditivos (ácido cítrico, benzoato de sódio e metabisulfito de sódio). Dezesete marcas de sucos comerciais foram compradas, em duplicata, no primeiro semestre de 2009, em supermercados de Botucatu-SP.

### 2.1 Produção em laboratório dos sucos de uva

Utilizando-se suco concentrado de uva, açúcar de cana e água, foram produzidos, em duplicata, sucos de uva, em acordo com a legislação brasileira. Também foram fabricadas bebidas com quantidade de suco abaixo do estabelecido pelo MAPA. Os sucos de uva foram fabricados com concentração de sólidos solúveis inicial de 14 °Brix (BRASIL, 2000). Em seguida, foram adicionadas quantidades crescentes - 0; 2,5; 5,0 até 20,0% - de açúcar de cana em relação à massa total de suco.

A quantidade teórica de fonte  $\text{C}_3$  dos sucos foi calculada por balanço de massa de sólidos solúveis desenvolvida a partir da Equação 4.

$$^{\circ}\text{Brix} = \frac{\text{Massa de Sólidos Solúveis da Solução}}{\text{Massa da Solução}} \cdot 100 \quad (4)$$

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

Para a análise isotópica dos produtos de uva, 0,35  $\mu\text{L}$ , em duplicata, foi acondicionado em cápsula de estanho, que foi empacotada e colocada no Analisador Elemental (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 sucos fabricados em laboratório e dos sucos comerciais de uva

Para purificação do açúcar extraído dos produtos de uva, foi utilizado o método proposto por Koziet et al. (1995). A solução de açúcar purificado (açúcar  $\text{C}_3$  + açúcar  $\text{C}_4$ ) obtida no final do procedimento foi acondicionada em cápsula de estanho e colocada no Analisador Elemental.

### 2.4 Análise isotópica do açúcar de cana e dos aditivos utilizados em sucos comerciais de uva

As amostras sólidas de açúcar e aditivos foram moídas em moinho criogênico com nitrogênio líquido (Spex CertiPrep 6750 Freezer/Mill) durante três minutos 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 líquidas (0,35 mL) foram preparadas e colocadas no Analisador Elemental.

### 2.5 Definição dos parâmetros de $\delta a$ e $\delta p$ na análise isotópica dos sucos de uva fabricados em laboratório

Na produção dos sucos fabricados em laboratório, foram utilizados suco concentrado de uva ( $\text{C}_3$ ) e açúcar de cana ( $\text{C}_4$ ). No suco concentrado, a análise isotópica foi feita no próprio suco ( $\delta a$ ) e na sua fração açúcar purificado ( $\delta p$ ). O valor isotópico do açúcar de cana ( $\delta b$ ) foi obtido a partir de banco de dados. Nos sucos fabricados em laboratório, a análise isotópica foi feita na própria bebida ( $\delta p$ ) e na sua fração açúcar purificado ( $\delta p$ ). Como foram mensurados dois valores isotópicos para  $\delta a$  e  $\delta p$ , obtiveram-se quatro combinações para se calcular a concentração de fonte  $\text{C}_3$  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  $\text{C}_3$  (calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis - item 2.1). Os *Erros* obtidos (|quantidade de fonte  $\text{C}_3$  teórica - quantidade de fonte  $\text{C}_3$  prática|) foram submetidos à análise de covariância ( $\alpha = 0,05$ ), utilizando o programa "SAS", conforme a Equação 5, na qual:  $y_{ij}$  = Erro observado da combinação  $i$  e nível  $j$  de  $x$ ;  $\alpha_i$  = efeito do  $i$ -ésimo tratamento;  $\beta$  = parâmetro da regressão linear;  $x_j$  = nível da concentração  $j$  de açúcar;  $e_{ij}$  = erro aleatório (ZAR, 1999).

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta x_j + e_{ij} \quad (5)$$

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, foi mensurada 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  $\text{C}_3$  nas etapas seguintes de desenvolvimento do método.

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva comerciais

FIGUEIRA, R. et al.

### 2.6 Comparação da mensuração de fonte $\text{C}_3$ entre sucos de uva fabricados sem e com aditivos

Para estimar a influência dos aditivos na quantificação de fonte  $\text{C}_3$  foram produzidos cinco sucos de uva com aditivos e cinco sem aditivos. Os sucos de uva foram fabricados com concentração de sólidos solúveis de 14 °Brix (BRASIL, 2000) sem adição de açúcar.

As quantidades de fonte  $\text{C}_3$  foram calculadas de acordo com o item 2.5 e comparadas estatisticamente utilizando-se o Teste  $t$  para amostras pareadas ( $\alpha = 0,05$ ) (ZAR, 1999).

Os aditivos utilizados na produção dos sucos foram o benzoato de sódio ( $0,050 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) e o metabissulfito de sódio ( $0,004 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), conforme Brasil (2007), e ácido cítrico ( $0,300 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) na quantidade informada pelas indústrias produtoras de bebidas de uva.

### 2.7 Precisão do método e estimativa de erro

Para verificar a precisão do método, os sucos fabricados em laboratório foram analisados como se fossem bebidas comerciais. Os valores isotópicos de  $\delta\text{a}$  e  $\delta\text{b}$  foram obtidos nos bancos de dados de suco concentrado e açúcar de cana, respectivamente.

Para estimar a precisão do método, foram feitas três combinações com os valores de  $\delta\text{a}$  e  $\delta\text{b}$ . Em  $\delta\text{a}$ , foram utilizados o valor isotópico mais leve, o médio e o mais pesado dos sucos concentrados ou de sua fração açúcar purificado, conforme citado no item 2.5. Em  $\delta\text{b}$ , foram utilizados o valor isotópico mais leve, o médio e o mais pesado dos açúcares de cana. Para  $\delta\text{p}$ , foi utilizado o valor isotópico do suco fabricado em laboratório ou de sua fração açúcar purificado, conforme citado no item 2.5. Utilizando-se as Equações 2 e 3, os valores isotópicos mais pesados, os médios e os mais leves de  $\delta\text{a}$  foram respectivamente agrupados com os valores isotópicos mais pesados, os médios e os mais leves de  $\delta\text{b}$ , juntamente com o valor isotópico de  $\delta\text{p}$ , para mensurar as quantificações de fonte  $\text{C}_3$ .

Os valores dessas três quantificações foram subtraídos dos valores teóricos de fonte  $\text{C}_3$  (item 2.1) para estimar o *Erro* e comparados seguindo os tratamentos estatísticos do item 2.5. Além disso, foi calculado o erro total do método (média dos *Erros* + desvio padrão) para cada combinação.

Definida a melhor combinação, os valores isotópicos de  $\delta\text{a}$  e  $\delta\text{b}$  foram utilizados para quantificar a percentagem de fonte  $\text{C}_3$  nos sucos comerciais. Nestes valores, foi acrescido e subtraído o erro total do método.

### 2.8 Percentagem de fonte $\text{C}_3$ mínima para sucos de uva comerciais

Para identificar se os sucos de uva estavam em conformidade ou inconformidade com as normas

brasileiras, foi necessário calcular a percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima, que fornece a menor concentração de fonte  $\text{C}_3$  que um suco de uva comercial deve apresentar para ser considerado legal, ante a legislação.

Para sucos de uva com adição de açúcar, a percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima foi obtida pela mensuração teórica, calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis (°Brix), em sucos com concentrações com sólidos solúveis em 14,0; 14,5; 15,0; 15,5; 16,0; 16,5, e 17,0 °Brix, adicionados com 10% de açúcar de cana em relação à massa de cada suco. Os valores da percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima foram calculados utilizando-se a equação 4 e relacionados com as respectivas concentrações de sólidos solúveis (14,0; 14,5; 15,0; 15,5; 16,0; 16,5, e 17,0 °Brix).

Nos sucos integrais (sem adição de açúcar – fonte  $\text{C}_4$ ), o percentual de fonte  $\text{C}_3$  deverá ser de 100%, independentemente do °Brix da amostra (percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima = 100% de carbono oriundo de fonte  $\text{C}_3$ ).

### 2.9 Concentração de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva comerciais

Para calcular a concentração de fonte  $\text{C}_3$  nos sucos de uva comerciais, foram utilizados os valores isotópicos de  $\delta\text{a}$  e  $\delta\text{b}$  definidos conforme o item 2.7. Para  $\delta\text{p}$ , foi utilizado o valor isotópico do suco comercial ou de sua fração açúcar purificado, conforme o item 2.5. Para cada concentração de fonte  $\text{C}_3$ , foi inserido o erro total do método (item 2.7).

Estes valores foram plotados em gráfico de dispersão e relacionados com os respectivos °Brix. Neste mesmo gráfico, foram inseridos os valores da percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima. Quando a concentração de fonte  $\text{C}_3$  ficou acima ou se sobrepôs à percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima, o suco estava em acordo com os padrões do MAPA. Quando a concentração ficou abaixo, o suco foi considerado em desacordo com os padrões legais.

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Análise isotópica das matérias-primas

Segundo Rossman (2001), o enriquecimento isotópico relativo existente nos vegetais de ciclos fotossintéticos  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$  também é observado nos seus produtos e subprodutos. Di Marco et al. (2006), estudando a variação do enriquecimento isotópico relativo de folhas e bagas de *Vitis vinifera*, obtiveram valores de -24,00‰. O valor isotópico dos sucos concentrados analisados no presente trabalho foi mais leve que os citados na literatura (Tabela 1). Segundo Boutton (1996), fatores ambientais (irradiação, umidade do solo, salinidade do solo etc) e biológicos (capacidade fotossintética, variação



## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva comerciais

FIGUEIRA, R. et al.

genética, competição etc) têm potencial para influenciar a composição isotópica de carbono nas plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ . Comparando-se o enriquecimento isotópico relativo dos sucos concentrados e da sua fração açúcar purificado, não foi observada diferença estatística entre eles (Teste  $t$ ,  $\alpha = 0,05$ ) (Tabela 1). Tal relação também foi relatada por Parker (1982) em um estudo com sucos concentrados, em que os valores do enriquecimento isotópico relativo de carbono do suco e do açúcar purificado foram correlacionados, apresentando pequena variação.

Koziet et al. (1995), analisando a composição isotópica de sucos de frutas e açúcares, encontraram o valor isotópico médio de  $-11,23 \pm 0,20\text{‰}$  para açúcar de cana. O valor isotópico mais leve foi  $-11,51 \pm 0,01\text{‰}$  e o mais pesado foi  $-10,76 \pm 0,22\text{‰}$ . Os valores isotópicos informados na Tabela 2 novamente são mais leves que os citados na referência. Comparando-se o valor isotópico dos três tipos de açúcares analisados, não houve diferença estatística (Teste de Tukey,  $\alpha = 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 1.** Enriquecimento isotópico relativo ( $\delta^{13}\text{C}$ ) dos sucos concentrados de uva. Banco de dados para  $\delta_a$ .

Nº	Suco ( $\delta\text{‰}$ )	Desvio médio	Açúcar purificado ( $\delta\text{‰}$ )	Desvio médio
1	-27,35	0,01	-27,67	0,01
3	-27,64	0,01	-27,66	0,01
5	-27,26	0,09	-27,23	0,04
6	-27,14	0,02	-27,27	0,00
Média	-27,35 <sup>a1</sup>		-27,46 <sup>a</sup>	
Desvio padrão	0,21		0,24	

<sup>1</sup>Teste  $t$  ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tabela 2.** Enriquecimento isotópico relativo ( $\delta^{13}\text{C}$ ) dos açúcares de cana. Banco de dados para  $\delta_b$ .

Nº	Açúcar	Média ( $\delta\text{‰}$ )	Desvio médio
7	Cristal	-13,38	0,12
8	Cristal	-13,20	0,09
9	Cristal	-13,18	0,04
10	Cristal	-13,06	0,13
11	Cristal	-12,83	0,00
12	Cristal	-12,92	0,02
Média		-13,09 <sup>a1</sup>	
Desvio padrão		0,20	
13	Líquido invertido	-13,30	0,11
14	Líquido invertido	-13,36	0,07
15	Líquido invertido	-13,21	0,04
Média		-13,29 <sup>a</sup>	
Desvio padrão		0,08	
16	Refinado	-13,03	0,08
17	Refinado	-13,16	0,04
18	Refinado	-12,77	0,11
Média		-12,99 <sup>a</sup>	
Desvio padrão		0,20	
Média geral		-13,11	
Desvio padrão		0,20	

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

### 3.2 Análise isotópica dos sucos de uva fabricados em laboratório

O valor isotópico do suco fabricado em laboratório e de sua fração açúcar purificado torna-se mais pesado à medida que aumenta a participação da fonte de carbono de origem  $\text{C}_4$  (açúcar de cana) na bebida fabricada em laboratório (Tabela 3).

### 3.3 Definição de $\delta_a$ e $\delta_p$ para quantificar a participação de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva fabricados em laboratório

Utilizando-se o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado de uva ou de sua fração açúcar purificado (Amostra 1 - Tabela 1) em  $\delta_a$ , do açúcar de cana (amostra 17 - Tabela 2) em  $\delta_b$ , do suco fabricado em laboratório ou de sua fração açúcar purificado (Tabela 3) em  $\delta_p$ , foram obtidas as quantificações práticas da percentagem de fonte  $\text{C}_3$  (Tabela 4).

Na análise de covariância, os valores do teste  $F$  foram significativos ( $p < 0,0001$ ). O teste de Tukey mostrou haver diferença estatística das combinações 1 e 3 para as combinações 2 e 4. Como a combinação 1 ( $\delta_a$  = suco concentrado,  $\delta_p$  = suco fabricado em laboratório) teve a menor variação dos Erros, esta foi a indicada para mensurar a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  em sucos de uva. Porém, como comprovado pela análise estatística, a combinação 3 também pode ser utilizada para tal finalidade (Tabela 4).

### 3.4 Comparação da mensuração de fonte $\text{C}_3$ entre sucos de uva fabricados sem e com aditivos

A quantificação de fonte  $\text{C}_3$  nos sucos fabricados sem e com aditivos foi realizada conforme o item 3.3. Nos sucos sem aditivos, a quantificação de fonte  $\text{C}_3$  ( $101,30 \pm 1,45\%$ ) não diferiu estatisticamente da bebida com aditivos ( $99,39 \pm 1,56\%$ ). Figueira (2008),

**Tabela 3.** Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 dos sucos fabricados em laboratório e na sua fração açúcar purificado.

Nº	%Aç <sup>1</sup>	$\delta_p$ ( $\delta\text{‰}$ )			
		Suco laboratório	Desvio médio	Açúcar purificado	Desvio médio
71	0,0	-27,20	0,00	-26,85	0,01
72	2,5	-24,85	0,03	-24,37	0,06
73	5,5	-23,20	0,06	-22,75	0,06
74	7,5	-22,17	0,06	-22,02	0,00
75	10,0	-21,47	0,01	-20,42	0,05
76	12,5	-20,02	0,02	-19,20	0,06
77	15,0	-19,85	0,05	-18,95	0,09
78	17,5	-18,89	0,01	-18,25	0,04
79	20,0	-18,21	0,03	-17,66	0,04

<sup>1</sup>Açúcar de cana (amostra 17) (m/m).

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva comerciais

FIGUEIRA, R. et al.

verificando a influência dos aditivos em sucos de maçã, relatou a mesma observação. Provavelmente, a pequena quantidade de aditivos adicionados em sucos de uva não seja representativa em relação às demais matérias-primas (suco concentrado de uva e açúcar de cana).

### 3.5 Precisão do método e estimativa de erro

Para calcular as concentrações de fonte  $\text{C}_3$  nos sucos fabricados em laboratório, em  $\delta\text{a}$  (suco concentrado - Tabela 1), foram utilizados os valores isotópicos de -27,64‰ (amostra 3), -27,35‰ (valor médio) e -27,14‰ (amostra 6). Para  $\delta\text{b}$  (açúcar de cana - Tabela 2), utilizaram-se os valores -13,38‰ (amostra 7), -13,11‰ (valor médio) e -12,77‰ (amostra 18). Em  $\delta\text{p}$ , foram usados os valores isotópicos dos sucos fabricados em laboratório (Tabela 3).

Na análise de covariância, os valores do teste  $F$  não foram significativos ( $p < 0,6519$ ). Portanto, não há diferença estatística entre as combinações 1, 2 e 3. Como os padrões de  $\delta\text{a}$  (-27,35‰) e  $\delta\text{b}$  (-13,11‰) da combinação 2 proporcionaram a menor variação dos Erros, estes padrões, juntamente com o erro total (2,56%), foram utilizados para mensurar a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  em sucos de uva comerciais (Tabela 5).

### 3.6 Percentagem de fonte $\text{C}_3$ mínima para sucos de uva comerciais

Para sucos de uva nos quais a legislação permite a adição de açúcar (adoçado e reconstituído), a percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima foi obtida conforme o balanço de massa mostrado na Tabela 6.

Alguns sucos de uva apresentam em suas embalagens a denominação "integral". Neste caso,

**Tabela 4.** Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte  $\text{C}_3$  nas combinações realizadas de  $\delta\text{a}$  e  $\delta\text{p}$  em sucos de uva fabricados em laboratório.

N°	%	% $\text{C}_3$	1		2		3		4	
			S x SL	Erro (%) <sup>2</sup>	S x ASL	Erro (%)	AS x SL	Erro (%)	AS x ASL	Erro (%)
71	0,00	100,00	98,91	1,09	96,48	3,52	96,76	3,24	94,38	5,62
72	2,50	84,52	82,35	2,17	79,00	5,52	80,56	3,96	77,28	7,24
73	5,00	72,68	70,75	1,92	67,55	5,13	69,22	3,46	66,08	6,60
74	7,50	63,33	63,50	0,17	62,40	0,92	62,12	1,21	61,05	2,28
75	10,00	55,75	58,56	2,81	51,16	4,59	57,29	1,54	50,05	5,70
76	12,50	49,49	48,31	1,19	42,57	6,93	47,26	2,24	41,64	7,85
77	15,00	44,24	47,15	2,91	40,77	3,47	46,12	1,88	39,88	4,36
78	17,50	39,76	40,35	0,59	35,87	3,89	39,47	0,29	35,09	4,67
79	20,00	35,90	35,59	0,31	31,71	4,18	34,82	1,08	31,02	4,87
Média				1,46 <sup>b3</sup>		4,24 <sup>a</sup>		2,10 <sup>b</sup>		5,46 <sup>a</sup>
Desvio padrão				1,04		1,66		1,23		1,68

<sup>1</sup>açúcar de cana (amostra 17) (m/m); <sup>2</sup>%fonte  $\text{C}_3$  teórico - %fonte  $\text{C}_3$  prático; <sup>3</sup>Teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ); S versus SL - suco concentrado ( $\delta\text{a}$ ) versus suco fabricado em laboratório ( $\delta\text{p}$ ); S versus ASL - suco concentrado ( $\delta\text{a}$ ) versus açúcar purificado extraído do suco fabricado em laboratório ( $\delta\text{p}$ ); AS versus SL - açúcar purificado extraído do suco concentrado ( $\delta\text{a}$ ) versus suco fabricado em laboratório ( $\delta\text{p}$ ); AS versus ASL - açúcar purificado extraído do suco concentrado ( $\delta\text{a}$ ) versus açúcar purificado extraído do suco fabricado em laboratório ( $\delta\text{p}$ ).

**Tabela 5.** Escolha dos melhores valores isotópicos para  $\delta\text{a}$  e  $\delta\text{b}$  para quantificar a participação de fonte  $\text{C}_3$  nos sucos de uva comerciais.

N°	% Aç <sup>1</sup>	% $\text{C}_3$	1		2		3	
			-27,64‰( $\delta\text{a}$ ); -13,38‰( $\delta\text{b}$ )	Erro (%) <sup>2</sup>	-27,35‰( $\delta\text{a}$ ); -13,11‰( $\delta\text{b}$ )	Erro (%)	-27,14‰( $\delta\text{a}$ ); -12,77‰( $\delta\text{b}$ )	Erro (%)
71	0,00	100,00	96,88	3,12	98,91	1,09	100,38	0,38
72	2,50	84,52	80,40	4,12	82,41	2,11	84,03	0,49
73	5,00	72,68	68,86	3,81	70,86	1,82	72,58	0,10
74	7,50	63,33	61,64	1,68	63,62	0,30	65,41	2,09
75	10,00	55,75	56,73	0,98	58,71	2,96	60,54	4,79
76	12,50	49,49	46,53	2,97	48,49	1,00	50,42	0,92
77	15,00	44,24	45,37	1,13	47,33	3,09	49,27	5,03
78	17,50	39,76	38,60	1,15	40,55	0,80	42,55	2,79
79	20,00	35,90	33,87	2,03	35,81	0,08	37,86	1,96
Média				2,33 <sup>a3</sup>		1,47 <sup>a</sup>		2,06 <sup>a</sup>
Desvio padrão				1,20		1,09		1,85
Erro total <sup>4</sup>				3,53		2,56		3,91

<sup>1</sup>açúcar de cana (amostra 17) (m/m); <sup>2</sup>%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.

**Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte  $\text{C}_3$  em sucos de uva comerciais**

FIGUEIRA, R. et al.

necessariamente, não poderá conter açúcar de cana na composição destas bebidas (BRASIL, 2009). Portanto, a quantificação de fonte  $\text{C}_3$  deverá ser sempre de 100%, independentemente do  $^{\circ}\text{Brix}$  da amostra (percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima = 100% de fonte  $\text{C}_3$ ).

**3.7. Análise isotópica e concentração de fonte  $\text{C}_3$  em sucos de uva comerciais**

Krueger (1995), comparando o valor isotópico de várias frutas, encontrou o valor de -26,80‰ para uva. Este valor é similar ao observado para suco integral e reconstituído (Tabela 7).

Para calcular a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  nos sucos de uva comerciais, foram utilizados, em  $\delta\text{a}$  e  $\delta\text{b}$ , os valores isotópicos de -27,35‰ e -13,11‰, respectivamente,

conforme os resultados obtidos no item 3.5. Em  $\delta\text{p}$ , utilizaram-se os valores isotópicos do suco comercial (Tabela 7), conforme definido no item 3.3. Para cada quantificação de fonte  $\text{C}_3$ , foi inserido o erro total de  $\pm 2,56\%$  (item 3.5).

Nos sucos integrais, a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  das amostras 37 e 41 ficaram abaixo da percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima e, por isso, não estavam em acordo com o MAPA. Todas as demais estavam em acordo com a legislação, pois a concentração de fonte  $\text{C}_3$  se sobrepôs à percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima (Figura 1).

Para os sucos reconstituídos e adoçados, somente a amostra 50 apresentou a concentração de fonte  $\text{C}_3$  abaixo da percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima. As demais estavam em acordo com as normas do MAPA (Figura 2).

**Tabela 6.** Balanço de massa para sucos de uva adicionados com 10% de açúcar de cana em relação à massa do suco.

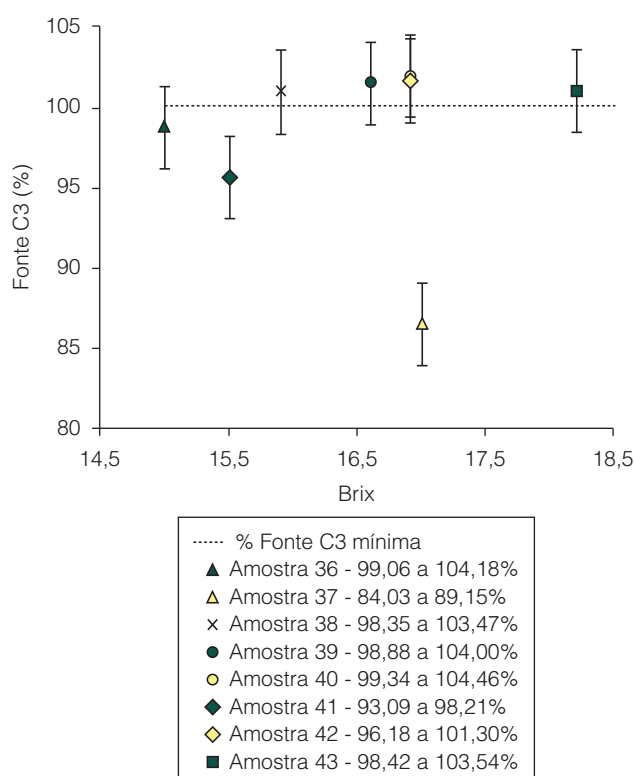
N°	$^{\circ}\text{Brix}$ suco	g suco	% açúcar	$^{\circ}\text{Brix}$ açúcar	g açúcar	$^{\circ}\text{Brix}$ suco adoçado	g suco adoçado	% Fonte $\text{C}_3$ Mínima
118	14,0	225	10	100	25	22,60	250	55,75
119	14,5	225	10	100	25	23,05	250	56,62
120	15,0	225	10	100	25	23,50	250	57,45
121	15,5	225	10	100	25	23,95	250	58,25
122	16,0	225	10	100	25	24,40	250	59,02
123	16,5	225	10	100	25	24,85	250	59,76
124	17,0	225	10	100	25	25,30	250	60,47

**Tabela 7.** Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos comerciais de uva e na fração açúcar purificado.

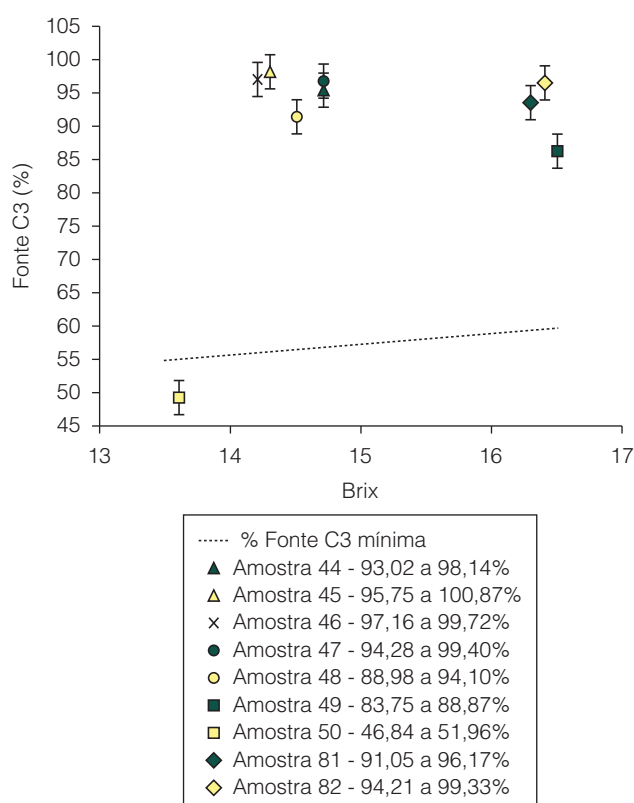
N°	Suco	$^{\circ}\text{Brix}$	Suco ( $\delta\text{‰}$ )	Desvio médio	Açúcar purificado ( $\delta\text{‰}$ )	Desvio médio
36	Integral	16,90	-27,58	0,04	-27,27	0,05
37	Integral	17,00	-25,44	0,03	-25,19	0,01
38	Integral	15,90	-27,48	0,04	-27,28	0,01
39	Integral	16,60	-27,56	0,04	-27,28	0,04
40	Integral	16,90	-27,62	0,02	-27,42	0,01
41	Integral	15,50	-26,73	0,05	-26,55	0,00
42	Integral	15,00	-27,17	0,05	-26,97	0,00
43	Integral	18,20	-27,49	0,05	-27,10	0,00
Média			-27,13		-26,88	
Desvio padrão			0,75		0,73	
44	Reconstituído	14,70	-26,72	0,04	-26,61	0,01
45	Reconstituído	14,30	-27,11	0,05	-27,09	0,04
46	Reconstituído	14,20	-26,95	0,02	-26,82	0,01
47	Reconstituído	14,70	-26,90	0,02	-26,86	0,04
48	Reconstituído	14,50	-26,15	0,03	-25,97	0,01
Média			-26,76		-26,67	
Desvio padrão			0,37		0,43	
49	Adoçado	16,50	-25,40	0,05	-25,07	0,01
50	Adoçado	13,60	-20,15	0,05	-19,96	0,02
81	Adoçado	16,30	-26,44	0,02	-26,39	0,01
82	Adoçado	16,40	-26,89	0,03	-26,84	0,02
Média			-24,72		-24,56	
Desvio padrão			3,11		3,16	

## Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte $\text{C}_3$ em sucos de uva comerciais

FIGUEIRA, R. et al.



**Figura 1.** Relação entre a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  e o °Brix para verificar a conformidade dos sucos de uva integrais em relação à legislação brasileira.



**Figura 2.** Relação entre a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  e o °Brix para verificar a conformidade dos sucos de uva reconstituídos e adoçados em relação à legislação brasileira.

## 4 Conclusões

A maioria dos sucos de uva analisados estava em conformidade com as determinações do MAPA.

O cálculo da percentagem de fonte  $\text{C}_3$  mínima foi uma importante inovação metodológica que possibilitou identificar as bebidas que estavam em conformidade com a legislação brasileira.

A metodologia de análise isotópica do Carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) mensurou com eficiência a quantidade de fonte  $\text{C}_3$  em sucos comerciais de uva, permitindo identificar com segurança as bebidas que não estavam em acordo com as determinações do MAPA.

## 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. chap. 2, p. 47-82.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre "Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 jan. 2007. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25812&word=bebidas%20c3%a1cido%20c%3%adtrico>>. Acesso em: 27 out. 2009.

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: 27 out. 2009.

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: 27 out. 2009.

DI MARCO, G.; GREGO, S.; TRICOLI, D.; TURI, B. Carbon Isotope Ratios ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) in Fractions of Field-Grown Grape. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 41, n. 2, p. 139-141, 2006.



**Método de análise isotópica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e quantificação da percentagem de fonte  $\text{C}_3$  em sucos de uva comerciais**FIGUEIRA, R. *et al.*

ESPERANCINI, M. S. T. Mercado brasileiro de bebidas. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.) **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 2, p. 21-49.

FIGUEIRA, R. **Análise isotópica da variabilidade natural do carbono-13 em suco, suco e refrigerante de maçã (Malus Domestica, Borkh)**. 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

GIESTEIRA, M. Vinícolas apostam no segmento de sucos. **Jornal do Comércio**, Porto Alegre, jul. 2009. Disponível em: <<http://jcrs.uol.com.br/jc/site/noticia.php?codn=4167&codp=21&codni=3>>. Acesso em: 29 jul. 2009.

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. chap. 7, p. 156-183.

KOZIET, J.; PICHLMAYER, F.; ROSSMANN A. Carbon, oxygen and hydrogen isotopic intercomparison of fruit and vegetable juices. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Reference**

**and intercomparison materials for stable isotopes of light elements**. Vienna, 1995. p. 75-80. IAEA-TECDOC-825.

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, v. 271, n. 1, p. 31-38, 1993.

KRUEGER, D. A. Applications of stable ratio analysis to problems of fruit juice adulteration. In: NAGY, S.; ATTAWAY, J. A.; RHODES, M. E. **Adulteration of fruit juice beverage**. 2. ed. New York: M. Decker, 1995. chap. 7, p. 109-124.

PARKER, P. L. The chemical basis for the use of carbon-13/carbon-12 to detect the addition of sweeteners to fruit juice concentrates. **Flüssiges Obst**, Schönborn, v. 49, p. 692-694, 1982.

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

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