

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**UTILIZAÇÃO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E
NITROGÊNIO NA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO E AVALIAÇÃO
ENERGÉTICA DE BEBIDAS DE LARANJA**

ELVIO CARDOSO QUEIROZ

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**UTILIZAÇÃO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E
NITROGÊNIO NA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO E AVALIAÇÃO
ENERGÉTICA DE BEBIDAS DE LARANJA**

ELVIO CARDOSO QUEIROZ

Orientador: **Waldemar Gastoni Venturini Filho**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Energia na Agricultura)

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Q3u Queiroz, Elvio Cardoso, 1968-
Utilização dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio na detecção de adulteração e avaliação energética de bebidas de laranja / Elvio Cardoso Queiroz. - Botucatu : [s.n.], 2005.
ix, 73 f. : il., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2005
Orientador: Waldemar Gastoni Venturini Filho
Inclui bibliografia.

1. Suco de laranja. 2. Carbono - Isótopos. 3. Nitrogênio - Isótopos. 4. Adulterações. 5. Alimentos - Teor calórico.
I. Venturini Filho, Waldemar Gastoni. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO. "UTILIZAÇÃO DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E NITROGÊNIO
NA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO E AVALIAÇÃO ENERGÉTICA DE
BEBIDAS DE LARANJA"**

ALUNO: ELVIO CARDOSO QUEIRÓZ

ORIENTADOR: PROF. DR. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO

Aprovado pela Comissão Examinadora:



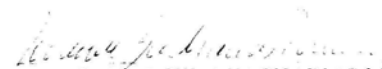
PROF. DR. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO



PROF. DR. LEA SILVIA SANTANA



PROF. DR. CARLOS DUCATI



PROF. DR. MARCELO ZACHARIAS MOREIRA



PROF. DR. HILARY CASTLÉ DE MENEZES

Data da Realização: 12 de dezembro de 2005.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP – Universidade Estadual Paulista do Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar este Curso.

Ao Prof. Dr. Waldemar Gastoni Venturini Filho, pela orientação segura, liberdade de trabalho, por ser um exemplo de envolvimento nas pesquisas e de preocupação na formação de seus orientados.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti, pelos ensinamentos, paciência, compreensão, apoio e segurança, que foram essenciais durante a realização do curso de doutorado.

Aos meus pais, Benedito e Eunice, pelo amor com que me criaram e educaram, e que com muito sacrifício permitiram mais essa conquista e me prepararam para a vida.

À minha namorada Kátia, pelo amor, companheirismo e compreensão que sempre me foram dedicados.

Aos meus irmãos e cunhada, por conferirem à nossa família amor solidez e segurança necessário a todos os momentos vividos.

Aos amigos do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Evandro, Silva e Cibele, pela preciosa amizade, apoio, convivência e auxílio na realização das análises isotópicas.

Aos colegas e amigos do curso de Pós-Graduação, Muris, Daniela, Roberto, Andressa, Ricardo e João.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo auxílio pesquisa processo nº 03/05467-2.

À Laranja Brasil pelo apoio financeiro.

À empresa Usina Nova América pelo apoio financeiro e fornecimento de matérias-primas.

À empresa Cargill pelo apoio financeiro e fornecimento de matérias-primas.

À empresa Frugor pelo fornecimento de matérias-primas.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| LISTA DE TABELAS..... | vi |
| LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| LISTA DE EQUAÇÕES..... | ix |
| 1. RESUMO..... | 01 |
| 2. SUMMARY..... | 03 |
| 3. INTRODUÇÃO..... | 05 |
| 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 08 |
| 4.1. Isótopos estáveis..... | 08 |
| 4.2. Plantas do ciclo fotossintético C ₃ e C ₄ | 11 |
| 4.2.1. Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C ₃ | 12 |
| 4.2.2. Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C ₄ | 13 |
| 4.3. Nitrogênio..... | 14 |
| 4.4. Aplicações dos isótopos estáveis em alimentos e bebidas..... | 15 |
| 4.5. Legislação brasileira sobre suco de laranja e derivados..... | 18 |
| 4.6. Laranja..... | 19 |
| 3.6.1. Indústria de suco..... | 20 |
| 4.7. Energia..... | 20 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 22 |
| 5.1. Material..... | 22 |
| 5.2. Planejamento experimental..... | 23 |
| 5.3. Análise isotópica..... | 23 |
| 5.3.1. Preparo de amostra líquida – bebidas..... | 24 |
| 5.3.2. Preparo de amostra líquida açúcar purificado..... | 24 |
| 5.3.3. Preparo de amostra sólida - polpa lavada com água e polpa lavada com acetona..... | 25 |
| 5.3.4. Produção de bebidas em laboratório..... | 26 |
| 5.3.5. Determinação de adulteração nos sucos comerciais..... | 28 |

| | |
|---|----|
| 5.4. Análises físico-químicas..... | 29 |
| 5.5. Análises energéticas..... | 30 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| 6.1. Matéria-prima..... | 31 |
| 6.2. Ajuste de equações para o cálculo do percentual de pureza (% C ₃)..... | 37 |
| 6.3. Bebidas comerciais..... | 48 |
| 6.4. Análises físico-químicas..... | 55 |
| 6.5. Análises energéticas..... | 59 |
| 6.6. Considerações finais..... | 62 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 64 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 65 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|--------|---|--------|
| 01 | Abundância natural dos isótopos estáveis em átomos %..... | 09 |
| 02 | Razão isotópica absoluta dos padrões internacionais..... | 10 |
| 03 | Características químicas de suco integral de laranja..... | 18 |
| 04 | Composição química de suco de laranja reconstituído e integral..... | 21 |
| 05 | Mistura entre suco de laranja reconstituído e açúcar de cana..... | 27 |
| 06 | Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em suco de laranja e suas frações..... | 32 |
| 07 | Enriquecimento relativo de nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) na polpa lavada com água de suco de laranja..... | 33 |
| 08 | Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em suco de tangerina e suas frações..... | 35 |
| 09 | Enriquecimento relativo de nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) na polpa lavada com água de suco de tangerina..... | 35 |
| 10 | Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em açúcar de cana..... | 38 |
| 11 | Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebida de laranja produzida com misturas conhecidas de suco de laranja e açúcar de cana..... | 39 |
| 12 | Porcentagem de contribuição dos açúcares na composição dos sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$) de suco integral fresco e reconstituído de laranja e tangerina..... | 40 |
| 13 | Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas de sucos de duas variedades de laranja e açúcar de cana..... | 41 |
| 14 | Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas conhecidas de suco de laranja e açúcar de cana e adicionado ácido cítrico..... | 43 |
| 15 | Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas conhecidas de suco de laranja e açúcar de cana e adicionado ácido cítrico, corante e goma xantana..... | 44 |
| 16 | Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas conhecidas de suco de laranja e açúcar de cana e adicionado ácido cítrico, corante e goma gelana..... | 45 |
| 17 | Calculo de % de C_3 nos sucos puros utilizando as equações propostas do presente trabalho..... | 46 |

| | | |
|----|--|----|
| 18 | Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em bebidas comerciais de suco de laranja integral e suas frações..... | 48 |
| 19 | Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em bebidas comerciais de suco de laranja e suas frações..... | 49 |
| 20 | Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em bebidas comerciais de suco concentrado, néctar, refresco de laranja e outros..... | 49 |
| 21 | Enriquecimento relativo de nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) na polpa lavada com água de bebidas de laranja comerciais..... | 50 |
| 22 | Porcentagem de C_3 na composição das bebidas comerciais de suco de laranja integral..... | 53 |
| 23 | Porcentagem de C_3 na composição das bebidas comerciais de suco de laranja..... | 53 |
| 24 | Porcentagem de C_3 na composição das bebidas comerciais de suco concentrado, néctar, refresco de laranja e outros..... | 54 |
| 25 | Análises físico-químicas de suco integral fresco e concentrado de tangerina e laranja..... | 56 |
| 26 | <i>Ratio</i> de variedades de laranjas e tangerinas..... | 57 |
| 27 | Análises físico-químicas de bebidas comerciais de laranja..... | 58 |
| 28 | Análise centesimal das bebidas comerciais de laranja com base de matéria seca | 60 |
| 29 | Valores energéticos expressos nos rótulos das bebidas comerciais e determinados por bomba calorimétrica e cálculo centesimal..... | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 01 | Fluxograma de purificação de açúcar..... | 25 |
| 02 | Distribuição do par isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) para sucos integrais frescos e sucos concentrados de laranja e tangerina..... | 36 |
| 03 | Distribuição do par isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) para bebidas de laranja comerciais..... | 52 |

LISTA DE EQUAÇÕES

| Equação | | Página |
|---------|--|--------|
| 01 | Enriquecimento isotópico relativo entre a amostra e o padrão internacional..... | 09 |
| 02 | Discriminação isotópica do carbono nas plantas C ₃ | 12 |
| 03 | Discriminação isotópica do carbono nas plantas C ₄ | 13 |
| 04 | Cálculo de <i>ratio</i> | 23 |
| 05 | Balanço de massa isotópico..... | 28 |
| 06 | Contribuição relativa da fonte C ₃ , considerando a polpa lavada com acetona como o padrão interno de laranja..... | 28 |
| 07 | Contribuição relativa da fonte C ₃ , considerando a polpa lavada com acetona como o padrão interno de laranja e inserido fator de concentração..... | 29 |

1. RESUMO

O presente trabalho analisou, através da metodologia dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, bebidas comerciais de laranja para detectar adulterações. Sob esta ótica, foram analisadas 33 bebidas comercializadas no mercado brasileiro e verificou se as mesmas estavam em conformidade com os padrões de identidade e qualidade da legislação brasileira. Primeiramente, foram coletados sucos concentrados sem adição de açúcar, sucos integrais fresco de laranja (*in natura*) e bebidas comerciais. As análises do teor isotópico de carbono-13 foram realizadas nos sucos e nas suas frações: açúcar purificado, polpa lavada com água e polpa lavada com acetona. Os sólidos insolúveis (polpa) foram usados como padrão interno para a quantificação da quantidade de açúcar de cana misturada à bebida comercial de laranja. A variabilidade do enriquecimento relativo natural do carbono nas amostras de laranja, tanto para os sucos concentrados, quanto para os sucos integrais frescos, mostrou-se alta, variando de -26,44 a -28,13‰ e -25,02 até -28,88‰, respectivamente. O balanço de massa isotópico, que considerou a contribuição dos açúcares na constituição dos sólidos solúveis (açúcar da fruta / °Brix da fruta) e (açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana), permitiu a quantificação de fonte C₃ em bebidas comerciais com erro da ordem de 3%, devido a variabilidade isotópica da polpa. As análises isotópicas das bebidas comerciais mostraram que

uma amostra de suco de laranja integral apresentou adição de açúcar, o que é proibido para esta classe de suco; uma amostra de suco concentrado apresentou 40% de adição de açúcar de cana, quando para este tipo de suco, é permitido no máximo 10% em relação ao seu °Brix; uma amostra de suco adoçado de laranja apresentou porcentual de carbono C₃ menor do que o mínimo permitido por lei, que para esta classe de suco é de no máximo 10% de açúcar em relação à massa do suco. O balanço de massa isotópico simples permitiu quantificar carbono de fonte C₃ em outras bebidas, como os repositores energéticos, bebida mista e “frutas cítricas”. O teor isotópico de carbono-13, para estas bebidas, é similar ao açúcar de cana -13‰, indicando adulteração. O enriquecimento relativo de ¹⁵N/¹⁴N foi analisado na fração polpa lavada com água, os isótopos de nitrogênio não puderam ser utilizados para indicar a mistura de sucos de tangerina com os de laranja, que é proibido por lei. Este trabalho permitiu concluir que para o período da pesquisa (2003-2004), os problemas de adulteração em bebidas comerciais foram pontuais. O balanço de massa isotópico, que considera a contribuição dos açúcares na constituição dos sólidos solúveis das bebidas de laranja, mostrou-se mais adequado para a quantificação de fontes C₃.

STABLE CARBON AND NITROGEN ISOTOPES IN THE DETECTION OF ADULTERATION AND ENERGY EVALUATION OF ORANGE BEVERAGES. Botucatu, 2005. 82p. Tese. (Doutor em Agronomia / Energia na Agricultura) Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ELVIO CARDOSO QUEIROZ

Adviser: WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO

2. SUMMARY

The present work analysed commercial orange beverages to detect adulteration. The methodology of stable carbon and nitrogen isotopes was used. Thirty-three orange beverages commercialised on the Brazilian market were evaluated for compliance with identity and quality standards of the Brazilian legislation. Frozen concentrated orange juices with no sugar addition and freshly squeezed orange juices were collected. The analysis of the carbon-13 isotope signal was carried out for the juice and its fractions: orange juice sugars, pulp washed with water and pulp washed with acetone. The insoluble solids content (pulp) was used as the internal standard for the quantification of the amount of sugar cane mixed with the commercial orange beverages. The variability of enrichment $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in the orange samples was high for both frozen concentrated orange juices and for freshly squeezed orange juices, showing values from -26.44 to -28.13‰ and from -25.02 to -28.88‰, respectively. The isotopic mass balance that considered the contribution of the sugars to the soluble solids content (fruit sugar / fruit °Brix) and (cane-sugar / cane-sugar °Brix), allowed for the quantification of C_3 in the commercial beverages with an error to the order of 3%, due to isotopic variability of the pulp. The isotopic analysis showed that one sample of freshly squeezed orange juice presented sugar addition, which is forbidden for this kind of juice. One

sample of commercial frozen concentrated orange juice presented 40% of sugar cane. For this kind of juice, the maximum addition permitted is 10% in relation to its °Brix. One sample of sweetened orange juice showed a C₃ carbon percentage lower than that allowed by law for this type of juice (maximum of 10% sugar in relation to the mass of the juice). The isotopic mass balance allows for the quantification of carbon C₃ in other kinds of beverages such as energy replacers and mixed and citrus fruit drinks. The carbon-13 isotopic signals for these beverages were similar to those of sugar cane (-13‰), indicating adulteration. The relative enrichment of ¹⁵N/¹⁴N was analysed in the washed pulp. The nitrogen isotopes could not be used to indicate mixtures of tangerine and orange juices, which are forbidden by law. This work allowed for the conclusion that for the period of the research (2003-2004), the problems of adulteration in commercial beverages were isolated. The isotopic mass balance that considers the contribution of the sugars in the constitution of the soluble solids of orange beverages was shown to be more appropriate for the quantification of C₃ sources.

Keywords: Orange juice, isotope, carbon, nitrogen, adulteration.

3. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo, chegando a produzir próximo de 14,7 milhões de toneladas na safra 2004/2005. Desse total quase 11 milhões de toneladas foram processados pela indústria de suco concentrado congelado (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CITRUS, 2005).

Apesar da importância do Brasil no mercado internacional de suco concentrado de laranja (80% do mercado), o consumo de suco de laranja industrializado é baixo no mercado interno brasileiro, quando comparado com outros tipos de bebidas, sendo estimado em 8,4 litros *per capita* ano (QUEIROZ; MENEZES, 2005).

O consumo de suco industrializado no Brasil é pequeno, quando comparado com as demais bebidas de importância comercial. Apenas na década de 90, a indústria de sucos passou a dar importância ao potencial do mercado nacional, isto em virtude da estabilidade econômica gerada a partir do “Plano Real” e das dificuldades no comércio internacional de suco concentrado e congelado (QUEIROZ; MENEZES, 2005).

Apesar da pequena participação no mercado interno, o suco industrializado da fruta pronto para beber no Brasil saltou de 30 milhões de litros em 1993

para 230 milhões de litros em 2000. A expectativa é que a evolução do segmento continue acentuada e chegue, em 2005, a 330 milhões de litros/ano (QUEIROZ; MENEZES, 2005).

A adulteração de suco de laranja tem sido relatada desde a década de 30, o interesse na adulteração desse produto foi despertado somente após o aumento do consumo do suco de laranja industrializado. A exemplo de outros países, isto começa a ser constatado no Brasil (NAGY et al., 1995; LARANJA BRASIL, 2003).

Nos últimos anos, o método da detecção de isótopos estáveis de carbono ganhou grande importância no controle da qualidade de alimentos e bebidas. O desenvolvimento desta técnica iniciou-se nas Ciências de Geofísica e Geoquímica e rapidamente foi introduzida na área de alimentos e bebidas para a determinação da origem vegetal dos produtos (ROSSMAN, 2001).

A aplicação desta metodologia em vegetais só foi possível graças a Melvin Calvin, James Bassham e Andrew Bensea, que na década de 50, elucidaram o ciclo fotossintético dos vegetais conhecido como Ciclo de Calvin. Na década de 60, os pesquisadores Marshal Hatch e Rodger Slack descobriram diferentes ciclos fotossintéticos nos vegetais, dividindo-os em três grupos: vegetais de ciclo fotossintético CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), C₃ e C₄ (CONTREIRAS, 1992).

Em função destes diferentes ciclos fotossintéticos, observam-se valores de enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$)¹ distintos entre plantas com diferentes metabolismos fotossintéticos. Plantas do ciclo fotossintético C₃ apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -22 a -34‰, com valor modal de -27‰. Plantas do ciclo fotossintético C₄ apresentam valores entre -9 a -16‰, com valor modal de -13‰. As plantas que apresentam o metabolismo CAM possuem valores intermediários de -11 a -29‰ (FRITZ; FONTES, 1986; DUCATTI et al., 2002).

Esta diferença no enriquecimento isotópico, existente principalmente nos vegetais C₃ e C₄, também é observada nos seus produtos e subprodutos, tornando-se uma ferramenta importante na detecção de adulteração em alimentos e bebidas, como por exemplo em bebidas alcoólicas, sucos, mel entre outros (FRITZ; FONTE, 1986; ROSSMANN, 2001).

¹ vide equação (1) na página 9.

A aplicação da diluição isotópica entre padrões de bebidas com valores isotópicos distintos, vem sendo utilizada no controle de bebidas que apresentam álcool ou açúcar de origem botânica diferente. A metodologia ganha importância devido a sua precisão em quantificar as adulterações no produto final, como por exemplo, vinho misturado com álcool de cana-de-açúcar (ROSSMANN, 2001).

Para vegetais que possuem o mesmo metabolismo fotossintético (C_3 ou C_4), a análise isotópica do carbono-13 não os diferencia. Neste caso, a utilização de um segundo isótopo, como por exemplo o nitrogênio, pode solucionar este problema metodológico (DUCATTI et al., 2002).

O isótopo de nitrogênio é relatado na literatura como um elemento importante na mensuração de duas fontes de matéria-prima de mesmo metabolismo fotossintético, como por exemplo: arroz e soja – plantas C_3 (MULVANEY, 1993). Neste caso, a razão isotópica do nitrogênio da soja é semelhante ao do ar atmosférico, enquanto que a do arroz fica próxima do teor isotópico do nitrogênio existente no solo.

Atualmente, as análises físico-químicas convencionais não determinam a origem botânica dos açúcares empregados na formulação da bebida. Consequentemente, a fiscalização do produto para verificar se o mesmo encontra-se dentro dos padrões exigidos por lei (BRASIL, 1997) fica prejudicada devido a sua difícil detecção.

A importância que a análise isotópica de alimentos e bebidas vem assumindo no mundo pode ser avaliada pelo fato da mesma ser a metodologia oficial empregada nos Estados Unidos da América nas análises de pureza de mel e sucos de frutas naturais. Além disso, a União Européia com a finalidade de detectar adição de açúcares comerciais durante a fermentação de vinhos introduziu, a partir de 1996, um rígido controle de qualidade baseado na análise isotópica do álcool destas bebidas.

O objetivo deste trabalho foi aplicar a metodologia de análise das razões isotópicas de $^{13}C/^{12}C$ e $^{15}N/^{14}N$ em bebidas de laranja, mensuradas por espectrometria de massa de razão isotópica, visando detectar adulterações nos produtos comercializados no mercado brasileiro.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Isótopos estáveis

O termo “isótopo” vem do grego *ISO* (mesmo ou igual) e *TOPOS* (lugar), referindo-se ao fato de que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. A expressão “estável” significa que não emitem radiação.

Isótopos são átomos do mesmo elemento químico, que apresentam diferentes propriedades físicas, com massa maior ou menor (diferem em número de nêutrons no núcleo do átomo) e mesmas propriedades químicas (possuem o mesmo número de elétrons na eletrosfera).

Isótopos estáveis do carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera. Cada elemento apresenta um isótopo leve dominante: carbono-12 (^{12}C), hidrogênio-1 (^1H), oxigênio-16 (^{16}O), nitrogênio-14 (^{14}N) e enxofre-32 (^{32}S), e um ou mais isótopos pesados: carbono-13 (^{13}C), hidrogênio-2 (^2H), oxigênio-17 (^{17}O), oxigênio-18 (^{18}O), nitrogênio-15 (^{15}N), enxofre-33 (^{33}S), enxofre-34 (^{34}S) e enxofre-36 (^{36}S).

Na natureza, a ocorrência do isótopo pesado de um elemento químico é menor que seu isótopo mais leve (Tabela 1). Aproximadamente 98,89 átomos % do carbono

existente é constituído por ^{12}C e apenas 1,11% de ^{13}C (ROSSMANN, 2001; BOUTTON, 1991a).

Tabela 1. Abundância natural dos isótopos estáveis em átomos %.

| Isótopo leve | Átomos % | Isótopo pesado | Átomos % | Gás analisado |
|-----------------|----------|-----------------|----------|---------------|
| ^1H | 99,9844 | ^2H | 0,0156 | H_2 |
| ^{12}C | 98,8890 | ^{13}C | 1,1110 | CO_2 |
| ^{14}N | 99,6340 | ^{15}N | 0,3660 | N_2 |
| ^{16}O | 99,7628 | ^{17}O | 0,0372 | CO_2 |
| | | ^{18}O | 0,2000 | CO_2 |
| ^{32}S | 95,0180 | ^{33}S | 0,7500 | SO_2 |
| | | ^{34}S | 4,2150 | SO_2 |
| | | ^{36}S | 0,0170 | SO_2 |

Adaptado: BOUTTON (1991a).

Os valores de enriquecimento do carbono-13 são expressos em delta per mil da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) da amostra em relação a um padrão internacional definido, *PeeDee Belemnite* PDB (DUCATTI et al., 1979). Trata-se de um fóssil carbonatado sólido, da era Cretácea, denominado *Belemnitela americana*, da formação geológica *PeeDee* do Estado norte-americano da Carolina do Sul (Tabela 2), o qual foi empregado inicialmente como padrão por Craig (1957).

A mensuração do enriquecimento isotópico relativo entre a amostra e o padrão é determinada pela expressão (1):

$$\delta(\text{amostra, padrão}) = [(R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}}) - 1] * 10^3 \quad (1)$$

A simbologia empregada na equação (1) significa:

$\delta(\text{amostra, padrão})$ = enriquecimento relativo da amostra versus padrão, expresso em per mil, adimensional;

R = razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, da amostra e do padrão, respectivamente, adimensional.

Segundo Boutton (1991c), a variação da razão isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e dos demais isótopos estáveis dos elementos químicos do nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e enxofre podem ser mensurados com grande precisão através do espectrômetro de massa de razões isotópicas (IRMS) ou espectrômetro de massa de razões isotópicas com dupla entrada (DI-IRMS).

A técnica da espectrometria de massa, na determinação das variações naturais das razões isotópicas do carbono apresenta erro da ordem de 0,2‰ e para o nitrogênio 0,3‰ (DUCATTI et al., 1979).

Para os isótopos estáveis do hidrogênio, o padrão internacional é o *Vienna Standard Mean Ocean Water*, abreviadamente V-SMOW, cujas razões isotópicas absolutas estão explícitas na Tabela 2. Para os isótopos estáveis do nitrogênio, o padrão aceito é o ar atmosférico, o qual é considerado uma mistura isotópica homogênea na superfície terrestre. Para os isótopos estáveis do enxofre, o padrão considerado é o mineral troilita do meteorito *Cañon Diable*, abreviadamente V-CDT. Conforme a Tabela 2, os padrões isotópicos do oxigênio podem ser o V-PDB ou V-SMOW, dependendo da sua aplicação (BARRIE; PROSSER, 1996; VERKOUTEREN, 2004).

Tabela 2. Razão isotópica absoluta dos padrões internacionais.

| Elemento | Razão isotópica | Padrão Internacional |
|-------------------------------|-----------------|---|
| $^2\text{H}/^1\text{H}$ | 0,00015576 | <i>Vienna standard mean ocean water</i> ; (V-SMOW) |
| $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ | 0,00200520 | |
| $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ | 0,00037300 | |
| $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ | 0,01123720 | <i>Vienna Peedee Belemnite</i> ; (V-PDB) |
| $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ | 0,00206710 | |
| $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ | 0,00037900 | |
| $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ | 0,00367650 | Nitrogênio Atmosférico; (N_2atm) |
| $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ | 0,04500450 | <i>Vienna Cañon Diable Meteorite Troilite</i> ; (V-CDT) |
| $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$ | 0,00810000 | |

Adaptado: VERKOUTEREN, 2004.

4.2. Plantas do ciclo fotossintético C₃ e C₄

As plantas do ciclo fotossintético C₃ (laranjeira, videira, cevada, etc.), durante a fotossíntese, absorvem o CO₂ através dos estômatos da folha pelo processo de difusão, que é transferido até as células do mesófilo (cloroplasto). Nestas células, ocorre o processo de síntese orgânica, onde a reação química entre o CO₂ com um composto de cinco carbonos (ribulose 1,5 difosfato) é catalizada pela enzima RuBP-carboxilase, formando duas moléculas de três carbonos (ácido 3-fosfoglicerato), que serão convertidas em açúcar (LEHNINGER et al., 1995).

Os vegetais com ciclo fotossintético C₄ (cana de açúcar, milho, gramíneas tropicais, etc.) possuem dois tipos de cloroplastos: o do mesófilo e o da bainha. Funcionalmente, a produção de carboidratos não ocorre nas células do mesófilo, mas sim nas células da bainha. O CO₂ que entra nos estômatos por difusão passa para as células do mesófilo, onde é fixado na forma de HCO₃⁻. Este composto reage com fosfoenol-piruvato (PEP), reação esta catalizada pela enzima PEP-carboxilase, formando oxalacetato, que por sua vez é reduzido a um composto de quatro carbonos (malato ou aspartato). Estes compostos são transportados para as células da bainha e nestas células são descarboxilados para formar o CO₂ e piruvato. O CO₂ concentrado por esse processo entra para o ciclo de síntese orgânica idêntico ao ciclo das plantas C₃ (LEHNINGER et al., 1995).

Ao longo do processo de produção de carboidratos, o carbono do CO₂ sofre um fracionamento isotópico, ocorrendo diminuição da concentração de ¹³C e aumento da concentração de ¹²C. Este fracionamento existente na fotossíntese foi elucidado por Fauquhar et al. (1982), no qual o enriquecimento isotópico relativo ocorre, principalmente, em função das propriedades bioquímicas de fixação primária de CO₂ por ação enzimática e, parâmetros físicos como a difusão e a relação da pressão interna e externa do CO₂ nos estômatos. Sendo assim, o valor do enriquecimento relativo ($\delta^{13}\text{C}$) varia, entre -22 a -34 ‰ para as plantas C₃ e entre -9 a -16‰ nas plantas C₄ (FRITZ; FONTES, 1986; BOUTTON, 1991b).

Esta diferença no enriquecimento relativo ($\delta^{13}\text{C}$) entre plantas C₃ e C₄ também é encontrada nos seus produtos derivados, como no açúcar, álcool, etc., podendo assim determinar com precisão qual a origem botânica do carbono em determinado produto (ROSSMANN, 2001).

4.2.1. Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C₃

Segundo Boutton (1996) e O'Leary (1992), a discriminação isotópica do carbono nas plantas C₃ pode ser expressa pelo modelo elucidado por Farquhar et al. (1982):

$$\delta_{\text{planta}} = \delta_{\text{atm}} - a - (b - a) (p_i/p_a) \quad (2)$$

A simbologia da equação (2) significa:

- “ δ_{planta} ”; enriquecimento relativo do tecido vegetal em relação ao padrão (PDB).
- “ δ_{atm} ”; enriquecimento relativo do CO₂ atmosférico em relação ao padrão (PDB), possuindo um valor modal de -8‰.
- “a”; difusão do gás carbônico pelos estômatos, onde há diferença nas taxas de difusão do ¹²CO₂ e do ¹³CO₂. Nesta fase, o ¹²CO₂ se difunde mais eficientemente que o ¹³CO₂, em função de ter menor massa atômica. Para esta etapa, ocorre um fracionamento isotópico, da ordem de +4,4‰.
- “b”; incorporação do CO₂ em um composto orgânico no ciclo bioquímico de síntese orgânica, onde a molécula de CO₂, através da ação da enzima RuBP-carboxilase, reage com um composto de 5 carbonos, formando duas moléculas de 3-PGA. Nesta etapa, ocorre grande fracionamento isotópico na ordem de +30‰, ocorrendo novamente enriquecimento em ¹²CO₂ e diminuição na concentração de ¹³CO₂.
- “ p_i/p_a ”; relação entre a pressão parcial intercelular de CO₂ (p_i) e a pressão parcial ambiental de CO₂ (p_a). Este parâmetro varia de acordo com a abertura dos estômatos, sendo, portanto, dependente das condições ambientais (temperatura, umidade, radiação solar, etc.).

Os valores positivos (a, b) indicam que o produto apresenta maior concentração de ¹²C que o estágio inicial, ao passo que valores negativos indicam enriquecimento de ¹³C. Observa-se, também, que os termos são constantes e a única variável é a relação p_i/p_a .

A respiração representa uma importante parte na provisão de carbono da planta, porém grande parte das evidências sugere que o fracionamento isotópico associado à respiração é pequeno. Desta forma, é desprezado.

4.2.2. Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C₄

Assim como na plantas C₃, a discriminação isotópica em plantas C₄ pode ser expressa pela equação 3 (BOUTTON, 1996; O'LEARY, 1992; FARQUHAR, 1983):

$$\delta_{\text{planta}} = \delta_{\text{atm}} - a + (b_4 + \phi b_3 - a) (p_i/p_a) \quad (3)$$

A simbologia empregada na equação (3) significa:

- “ δ_{planta} ”; enriquecimento relativo do tecido vegetal em relação ao padrão (PDB).
- “ δ_{atm} ”; enriquecimento relativo do CO₂ atmosférico em relação ao padrão (PDB), possuindo valor modal de -8‰.
- “a” representa a difusão do CO₂ pelo estômato, processo que ocorre igualmente em plantas C₃, com valor +4.4‰.
- “b₄”; após entrar pelos estômatos, o CO₂ segue para as células do mesófilo foliar, onde ocorre a passagem do CO₂ para HCO₃⁻. Nesta reação as duas formas de carbono CO₂ (¹³CO₂ e ¹²CO₂), reagem de maneira diferenciada gerando diferença isotópica no produto final. Para esta reação atribui-se um valor e₄ = -8‰, ocorrendo aumento da concentração de ¹³C. Após a formação de HCO₃⁻, ainda nas células do mesófilo, ocorre a incorporação desse produto em um transportador (malato ou aspartato) pela ação da enzima PEP-carboxilase. Nestas reações ocorre o fracionamento isotópico com valor b'₄ = +2‰. Portanto, o efeito líquido da incorporação do CO₂ em um transportador será expresso por um valor denominado b₄ = e₄ + b'₄, ou seja, b₄ = -6‰.
- “ ϕ ”; o CO₂ incorporado em uma molécula de malato ou aspartato é transportado para as células da bainha, onde entra no ciclo bioquímico de síntese orgânica idêntico ao ciclo das plantas C₃. Neste momento, parte do CO₂, ao invés de entrar neste ciclo, pode retornar para as células do mesófilo podendo ser reincorporado ou retornar à atmosfera. Esta taxa de CO₂ que retorna para as células da bainha já foi estimada em 0,37.
- “b₃”; significa incorporação do CO₂ em um composto orgânico pela ação da RuBP-carboxilase nas células da bainha, na qual ocorre grande fracionamento isotópico, atribuindo-se um valor de +30‰, ocorrendo enriquecimento do ¹²CO₂ e diminuição da concentração de ¹³CO₂.

- “ p_i/p_a ”; comentada anteriormente, nos parâmetros de discriminação isotópicas das plantas C_3 .

4.3 Nitrogênio

As plantas utilizam o nitrogênio como precursor de aminoácidos, proteínas, enzimas e nucleotídeos. Portanto, é vital a participação do nitrogênio no metabolismo das plantas contribuindo para a perpetuação da espécie (HAYNES, 1986).

A forma predominante de nitrogênio disponível para plantas é o amônio, podendo ser incorporada à planta por diferentes processos, incluindo o armazenamento, translocação, redução e incorporação orgânica (HAYNES, 1986).

No entanto, segundo Haynes (1986), as plantas apresentam rotas metabólicas distintas quanto ao aproveitamento de fontes de nitrogênio de acordo com a espécie, cultivar, presença de microrganismos (associação micorrízica), ambiente (temperatura, pH do solo, etc.) e tipo de nutriente (amônio ou nitrato).

O acúmulo de formas nitrogenadas em plantas é variável com a espécie e cultivar, parte da planta, ambiente (temperatura, luminosidade, fotoperíodo). O amônio é, preferencialmente, acumulado em talos, pecíolos e folhas intermediárias, e em menor concentração nas raízes e partes reprodutivas. Por outro lado, o nitrato acumula-se nas partes mais velhas das plantas, como as raízes (GOH; HAYNES, 1986).

O armazenamento de proteínas ou fontes nitrogenadas é realizado durante o desenvolvimento celular, em diferentes níveis e regulado pela expressão gênica, ou seja, é controlado geneticamente sendo diferente de espécie para espécie (MORTON et al., 1995).

Blackburn e Knowles (1993) relatam que não há evidência de grandes oscilações no enriquecimento isotópico de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nos reservatórios naturais de nitrogênio (ar, solo, água). Segundo os mesmos autores, ocorre discriminação isotópica durante o processo de desnitrificação, fixação de nitrogênio e mineralização de N-orgânico.

Handley e Raven (1992) relatam que o teor isotópico presente num determinado tipo de solo nem sempre reflete no teor isotópico da planta que se desenvolve no local. Para que as plantas possam assimilar o nitrogênio, este sofre os processos de

mineralização (NH_4^-) e nitrificação (NO_3^-), induzindo o fracionamento do ^{15}N durante o processo. Em função da concentração destes compostos no solo e da espécie de planta cultivada, quanto maior a concentração maior o fracionamento e vice e versa.

Yoneyama (1996) e Yoneyama et al. (2001) reportam que os adubos nitrogenados utilizados na agricultura possuem valores de enriquecimento relativo para nitrogênio-15 próximo a 0‰, isto porque a fonte de nitrogênio utilizada pelas indústrias para a fabricação do adubo é o nitrogênio atmosférico. Contudo, os solos que são cultivados e que recebem adubação durante o seu manejo para a produção agrícola, possuem valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre +5 a +10‰. Este fracionamento é devido às transformações que o nitrogênio sofre no solo (ciclo do nitrogênio).

4.4. Aplicações dos isótopos estáveis em alimentos e bebidas

O problema de detecção de adulteração em alimentos é um enorme desafio para a indústria. Assim como produtos fraudulentos possuem sofisticadas formulações de imitações, as metodologias atuais de detecção se tornaram obsoletas. Recentemente, vem se desenvolvendo uma nova análise tecnológica em metodologia de análise de razão isotópica de alta precisão (KRUEGER, 1995).

Rossi et al. (1999) demonstraram a viabilidade do método na detecção da adição de açúcar de cana (planta C_4) em méis. O trabalho analisou méis de diversas regiões do Estado de São Paulo, quanto a sua origem botânica (laranja, floral e eucalipto - todas plantas C_3), obtendo resultados precisos em suas análises quanto à pureza do mel. Estes autores comprovaram que méis de plantas C_3 produzidos próximos a usinas de açúcar e álcool, apresentavam valores em suas razões isotópicas que indicavam a presença de açúcar de cana. Porém, esta possível adulteração não era proveniente dos produtores, e sim devido à presença da cana-de-açúcar na região, sendo que as abelhas faziam o uso do açúcar proveniente dos colmos de cana cortada, ou seja, um mal manejo no apiário.

Giménez-Mirales et al. (1999) e Guillou et al. (1998) mostraram que o método da diluição isotópica é uma ferramenta importante na determinação da origem botânica do álcool presente em vinhos, sendo facilmente detectada a adição de açúcar de cana para auxiliar a fermentação na produção de vinhos. Estes autores relatam ainda que, através

das análises das razões isotópicas de carbono e hidrogênio do álcool dos vinhos é possível determinar a região de origem da bebida.

Guillou et al. (1999) analisaram a adição de açúcar em suco de laranja, abacaxi e uva, importados de Israel, do Brasil e da Indonésia pela Comunidade Comum Européia. Os resultados obtidos mostraram que os sucos oriundos do Brasil e de Israel não apresentaram a adição de açúcar, mas em algumas amostras de sucos da Indonésia foram observadas a adulteração com açúcar. A adulteração pode não ocorrer no país de origem do produto, e sim nas empresas distribuidoras, desta maneira, não basta exigir dos países de origem a qualidade do produto, mas também há a necessidade de investigar as empresas que distribuem o produto.

Warembourg (1993) cita que o princípio da diluição isotópica é baseado na suposição de que duas fontes que diferem em sua composição isotópica quando uniformemente misturadas, resultam numa composição que reflete as quantidades relativas dessas duas fontes.

Simpkins et al. (2000), quando analisaram suco integral fresco de laranjas australianas, encontraram uma maior variabilidade natural do $\delta^{13}\text{C}$ de -22,5 a -27,3‰, e de -24,2 a -26,2‰ para os sucos concentrados. O mesmo autor afirma que, as diferenças climáticas como temperatura e umidade, as diferenças geográficas como latitude e altitude das regiões australianas, são fatores que afeta a absorção do CO_2 e interferem durante a fotossíntese em suas diversas etapas metabólicas para a fixação primária do carbono e, conseqüentemente, afeta a razão isotópica da planta.

As empresas que industrializam o suco de laranja acumulam diversos lotes de suco concentrado em tanques silos (*farm tank*) provocando uma diluição isotópica. Os frutos com teor isotópico mais pesado e mais leve, quando misturados apresentam um valor intermediário, isto pode ser um dos motivos desta menor variação do teor isotópico nos sucos concentrados (SIMPKINS et al., 2000).

Segundo Parker (1982) citado por Doner (1995), os sinais isotópicos das frações do suco (açúcar, ácidos, sólidos insolúveis, casca e semente) são praticamente os mesmos, com pequena variação entre as frações.

Segundo Fritz e Fontes (1986) existe uma variação entre o teor isotópico $\delta^{13}\text{C}$ nos tecidos vegetais e os compostos orgânicos que os constituem. Na maioria dos vegetais, as folhas e os carboidratos possuem sinais isotópicos próximos, mas os ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos, carotenóides e lipídeos não possuem este mesmo comportamento, visto que podem apresentar sinais isotópicos mais leves ou pesados em função de cada espécie de vegetal.

Jamin et al. (1998) analisaram sucos integrais frescos de laranja e tangerina de maneira fracionada: açúcar do suco; ácido málico e ácido cítrico. O teor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ do açúcar é mais leve que o $\delta^{13}\text{C}$ do ácido málico, que por sua vez também é mais leve que o enriquecimento relativo de $\delta^{13}\text{C}$ do ácido cítrico. Os autores justificam que, este fracionamento isotópico entre os compostos orgânicos do suco, está relacionado ao metabolismo vegetal.

De acordo com Jamin et al. (1998), estas diferenças dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ do açúcar do suco, ácido málico e ácido cítrico estão relacionados com a qualidade e a espécie de fruta, mas no caso de sucos concentrados esta diferença tende a diminuir. Uma vez que na indústria os frutos processados nem sempre estão no seu ponto ideal de maturação, diferente de suco produzido em laboratório que utilizou frutos maduros.

Rossmann et al. (1997), realizaram um estudo entre laboratórios com suco integral fresco de laranja e usaram a polpa como um padrão interno para a autenticidade de suco de laranja puros e misturados com açúcar de cana. Na metodologia proposta por estes autores, os sólidos insolúveis (polpa) passam por um tratamento com acetona para eliminar os carotenóides, uma vez que estes podem interferir no teor isotópico.

A utilização de um composto químico como uma referência isotópica interna tem uma grande importância na autenticidade de alimentos. A maioria das técnicas isotópicas de autenticidade requer um banco de dados de valores isotópicos do produto autêntico o qual as amostras comerciais são confrontadas. Um banco de dados consome um grande tempo para formá-lo e é caro (KELLY, 2003).

4.5. Legislação brasileira sobre suco de laranja e derivados

A legislação brasileira define suco de laranja como sendo a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da laranja (*Citrus sinensis*), através de processo tecnológico adequado. O suco não poderá conter substâncias estranhas à fruta, sendo proibida a adição de aromas e corantes artificiais. Não será permitida a associação de açúcares e edulcorantes hipocalóricos e não calóricos na fabricação de suco (BRASIL, 1999). De acordo com a legislação brasileira, o suco de laranja integral deve apresentar as seguintes características químicas:

Tabela 3. Características químicas de suco integral de laranja.

| | Mínimo | Máximo |
|-----------------------------------|--------|--------|
| Sólidos solúveis em °Brix, a 20°C | 10,5 | - |
| <i>Ratio</i> | 7,0 | - |
| Ácido ascórbico (mg/100g) | 25,00 | - |

Adaptado: BRASIL (1997).

Suco integral: suco sem adição de açúcar e na sua concentração natural, sendo vedada o uso de tal designação para o suco reconstituído (BRASIL, 1997).

Suco de fruta: poderá ser adicionado açúcar na quantidade máxima fixada, através de ato administrativo, observado o percentual máximo de dez por cento em peso, calculado em gramas de açúcar por cem gramas de suco (BRASIL, 2000).

Suco concentrado: suco parcialmente desidratado, podendo ser adicionado açúcar na quantidade máxima fixada para cada tipo de suco, através de ato administrativo, observado o percentual máximo de 10% (dez por cento) em peso, calculado em base de sólidos solúveis naturais do suco e deve ser mencionado no rótulo (BRASIL, 1997).

Suco desidratado: suco no estado sólido, obtido pela desidratação do suco integral, devendo conter a expressão "suco desidratado" (BRASIL, 1997).

Suco reconstituído: suco obtido pela diluição de suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor de sólido solúvel mínimo estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco integral, sendo obrigatório constar de sua rotulagem a origem do suco utilizado para sua elaboração, se

concentrado ou desidratado, sendo opcional o uso da expressão "reconstituído" (BRASIL, 1997).

Néctar: é a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal e açúcares, podendo ser adicionada de ácidos, e destinada ao consumo direto devendo conter no mínimo 31% de suco de fruta (BRASIL, 1997).

Bebida ou refresco de laranja: é a bebida não gaseificada, não fermentada, obtida pela diluição em água potável do suco de fruta, adicionada de açúcar, devendo conter no mínimo 30% de suco de fruta (BRASIL, 1998).

4.6. Laranja

A laranjeira é de origem asiática, sendo uma árvore de porte médio, podendo atingir até 8 metros de altura, o tronco possui casca castanho-acinzentada, a copa é densa de formato arredondado. As folhas possuem textura firme e bordos arredondados e exala aroma característico quando maceradas. As flores são pequenas, de coloração branca, aromáticas e atrativas para abelhas (HENDRIX; REDD, 1995).

O fruto possui formato e coloração variável de acordo com a variedade, freqüentemente com casca de cor amarela, envolvendo polpa aquosa de coloração que pode variar de amarelo-claro a vermelha. O período de frutificação concentra-se de abril a setembro (CHEN et al., 1993).

Os principais componentes do suco das laranjas comuns são os carboidratos (açúcares), que constituem mais de 70% dos sólidos solúveis. O segundo, em participação, são os ácidos orgânicos, principalmente cítrico e málico, que representam até 10% dos sólidos solúveis. Os restantes são aminoácidos livres, bases nitrogenadas (6%), íons inorgânicos (aproximadamente 3%), vitaminas (2,5%), lipídios (1,2%), flavonóides (1,2%) e outros (HENDRIX; REDD, 1995).

4.6.1. Indústria de suco

A indústria de suco concentrado congelado, iniciada há mais de três décadas no Brasil, apresenta contínuo desenvolvimento em termos de volume processado e correspondente exportação. Na década de 90 as exportações foram em média de 916.000t. O enorme volume processado desde o início da década de 80 levou o Brasil a se tornar o primeiro produtor e exportador de suco cítrico concentrado (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CITRUS, 2005).

No Brasil, o processamento de suco concentrado está restrito à praticamente quatro variedades de laranja: a Hamlin por ser considerada como precoce, a Pêra para a meia estação e a Natal e Valência, que são tardias. Com essas quatro variedades, a indústria processa citros de julho a dezembro de cada ano com maiores índices de sazonalidade, e até fevereiro do ano seguinte com menores índices, sendo março a maio o período de entre safra (CHEN et al., 1993).

Segundo a FAO, o processamento de citros no Brasil passou de 14 milhões de toneladas na década de 70 para 18 milhões nos anos 80 e ultrapassou 25 milhões de toneladas em 90. Na industrialização dos citros, as laranjas representam 84,19% do total, as tangerinas 3,17%, os limões e as limas ácidas 6,02% e os pomelos 6,60% (HENDRIX; REDD, 1995).

4.7. Energia

Uma caloria (equivalente mecânico do calor) é a quantidade de calor necessária para elevar a temperatura de 14,5°C para 15,5°C de um grama de água. Uma caloria corresponde a 4,1868J.

Um *Joule* é o trabalho realizado por uma força constante de 1 Newton que desloca seu ponto de aplicação em 1 metro na sua direção. Esta unidade é utilizada pelo Sistema Internacional de Medidas como unidade oficial para expressar as grandezas de trabalho, energia ou quantidade de calor.

Apesar do valor energético ou calórico dos alimentos ser expresso em calorias, o *Joule* (J) é a medida utilizada pelo Sistema Internacional.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a rotulagem nutricional se aplica aos alimentos produzidos e comercializados, qualquer que seja sua origem, embalados na ausência do cliente e prontos para serem oferecidos aos consumidores (BRASIL, 2003).

São três as formas de se determinar o valor energético de um alimento. Duas dessas formas são através da utilização de tabelas de composição química, sendo que a primeira é feita através da formulação do produto (lista de ingredientes e quantidade dos mesmos), ou seja, é necessária a composição química de cada ingrediente do alimento.

A segunda forma calcula diretamente através o valor energético da composição química do produto pronto, não sendo necessário a formulação do produto. Conforme observado na Tabela 4.

Tabela 4. Composição química de suco de laranja reconstituído e integral.

| Componente | Unidade | Valores por 100 gramas | | |
|-------------|---------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| | | Suco de laranja integral (USP) | Suco de laranja reconstituído (USDA) | Suco de laranja integral (USDA) |
| Água | g | 90,34 | 88,40 | 88,30 |
| Energia | kcal | 39 | 44 | 45 |
| Energia | kJ | 161 | 184 | 188 |
| Proteína | g | 0,84 | 0,80 | 0,70 |
| Lipídeos | g | 0,22 | 0,27 | 0,20 |
| Cinzas | g | 0,29 | 0,48 | 0,40 |
| Carboidrato | g | 8,31 | 10,06 | 10,40 |
| Fibras | g | não analisado | 0,20 | 0,20 |
| Açúcares | g | não analisado | 8,40 | 8,40 |

Adaptado: USDA, 2005; USP, 2005.

A terceira forma de confeccionar a tabela de informação nutricional para os valores energéticos é através de laudos de laboratórios, sendo necessário uma análise físico-química do produto.

Essas tabelas de composição química de alimentos podem ser encontradas em:

- Site da ANVISA: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/tabela.htm>>;
- Site da USDA: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>>;
- Tabela de Composição de Alimentos do ENDEF, IBGE;
- Software Virtual Nutri, Universidade de São Paulo, 1996.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista, UNESP, no Laboratório de Bebidas da Faculdade de Ciências Agrônômicas e no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu.

5.1. Material

- Suco integral fresco de laranja de diferentes variedades e regiões do Estado de São Paulo;
- Suco concentrado de cada variedade de laranja;
- Bebidas de laranja comercializadas no mercado interno brasileiro;
- Açúcar de cana de diferentes regiões;
- Ácido cítrico, pectina e outros aditivos usados na elaboração das bebidas comerciais (obtidos junto às mesmas empresas fornecedoras das indústrias).

5.2. Planejamento experimental

As análises isotópicas de carbono foram realizadas nas bebidas comerciais e naquelas produzidas em laboratório e nas seguintes frações: açúcar purificado do suco, polpa lavada com água e na polpa lavada com acetona.

A análise isotópica de nitrogênio foi realizada na polpa lavada com água.

Em laboratório, foram produzidas bebidas com misturas conhecidas entre suco de laranja e açúcar de cana para adequação da equação de cálculo de porcentagem de participação do carbono de laranja na mistura.

No suco integral fresco e suco reconstituído foram realizadas análises físico-químicas de açúcares redutores totais, °Brix e acidez titulável. O *ratio* foi determinado pela equação 4.

$$\mathbf{Ratio = \text{°Brix} / \text{acidez titulável}} \quad \mathbf{(4)}$$

Nas bebidas comerciais de laranja foram realizadas análises físico-químicas de °Brix, acidez titulável, análise centesimal e calorimetria.

Todas as análises físico-químicas e isotópicas foram feitas em duplicata.

5.3. Análise isotópica

A análise isotópica foi feita em amostras líquidas (bebidas e açúcar purificado) e em amostras sólidas (polpa lavada com água e polpa lavada com acetona).

5.3.1. Preparo de amostra líquida - bebidas

Das amostras de bebidas previamente homogeneizadas, foi coletado 0,35µL com auxílio de pipeta volumétrica e em seguida transferido para cápsulas de estanho contendo Chromosorb W, empacotadas e colocadas no Analisador Elementar (EA 1108 – CHN – Fisons Elemental Analyzer).

Neste equipamento, as amostras foram queimadas (*flash* de combustão) a 1020°C, liberando CO₂. No Espectrômetro de Massa de Razão Isotópica (Delta S Finnigan Mat), o CO₂ proveniente da combustão foi comparado com o CO₂ padrão para a determinação do δ‰ ¹³C da amostra.

5.3.2. Preparo de amostra líquida - açúcar purificado

Na análise isotópica de carbono-13 dos açúcares contidos nas bebidas, seguiu-se a metodologia de extração e purificação proposta por Koziat et al. (1993), conforme o esquema da Figura 1.

Uma alíquota de 100mL de bebida foi centrifugada a 3500rpm (1250g) durante 10 minutos para remover os sólidos insolúveis. Em seguida, ao líquido livre dos sólidos insolúveis, foi adicionado 4g de Ca(OH)₂ e aquecido até atingir a temperatura de 90°C. A amostra foi novamente centrifugada (nas mesmas condições da primeira centrifugação), para retirar os ácidos orgânicos que reagiram com o Ca(OH)₂.

Ao sobrenadante, foi adicionado H₂SO₄ a 2N até atingir pH 5, em seguida o líquido foi aquecido novamente até atingir a temperatura de 90°C e, após resfriado à temperatura ambiente, a amostra foi acondicionada a temperatura de 4°C por 12h, para remoção do excesso de Ca. Neste período ocorreu a formação de CaSO₄ (gesso) o qual foi desprezado.

Na solução resultante, contendo açúcar purificado, seguiu-se o mesmo procedimento do item anterior, para a determinação do enriquecimento relativo de carbono-13.

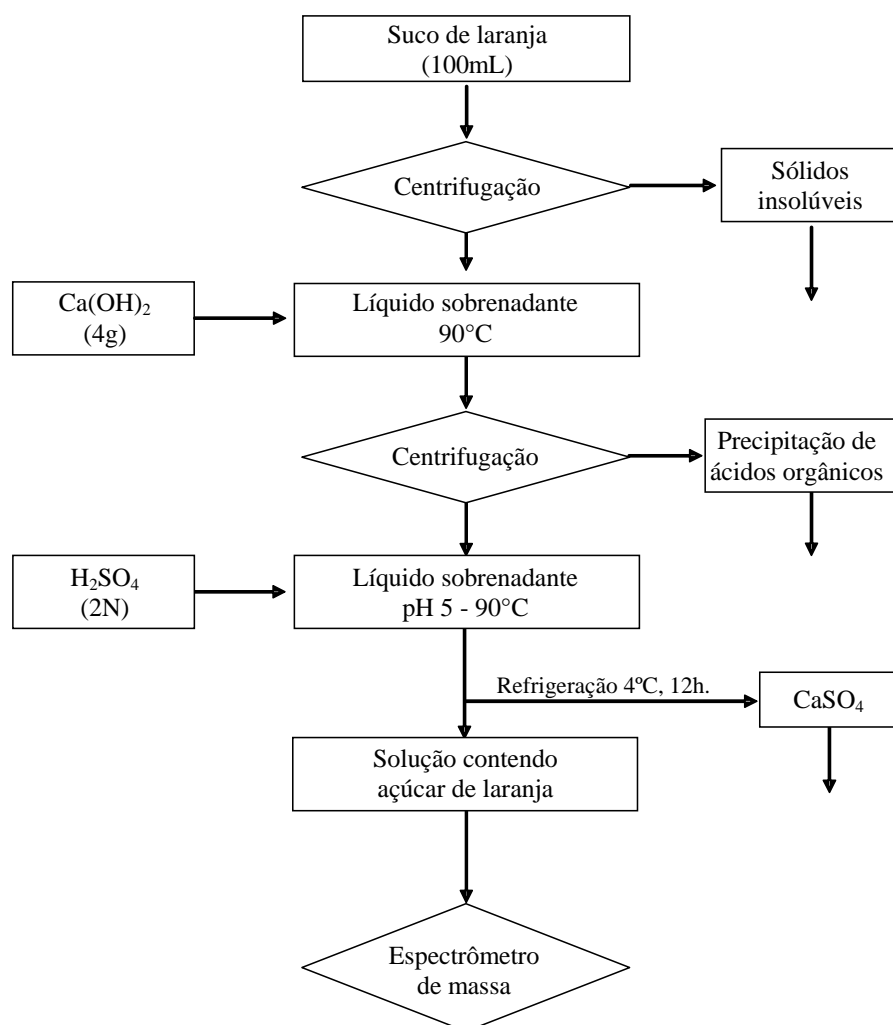


Figura 1. Fluxograma de purificação de açúcar (KOZIET et al., 1993).

5.3.3. Preparo de amostra sólida - polpa lavada com água e polpa lavada com acetona

A polpa, retida no tubo de centrifuga de 50mL da primeira centrifugação, recebeu 20 mL de água destilada. Foi agitado para a suspensão dos sólidos insolúveis durante 1 minuto. Em seguida, o volume foi completado para 50mL com água destilada e subsequentemente, centrifugado a 3500rpm (1250g) durante 10 minutos. Repetiu-se este procedimento por mais quatro vezes (°Brix = zero). Ao final deste procedimento, obteve-se a fração de polpa lavada com água.

A polpa lavada com acetona seguiu o mesmo procedimento acima descrito. À polpa lavada com água, foram adicionados 30mL de acetona pura. O tubo de centrífuga foi agitado durante 1 minuto e novamente centrifugado nas condições citadas acima. Repetiu-se mais uma vez este procedimento e, em seguida mais duas lavagens com água destilada. Ao final deste procedimento, obteve-se a fração de polpa lavada com acetona.

As amostras das frações de polpa lavada com água e com acetona foram transferidas para tubos *ependorffs* e liofilizadas.

Na análise isotópica de carbono das duas frações de polpa, foi pesado 0,03mg de amostra, em cápsulas de estanho. Na análise isotópica de nitrogênio, usada somente para a fração de polpa lavada com água, foi pesado 1,2mg de amostra em cápsulas de estanho. Após, seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 5.3.1.

5.3.4. Produção de bebidas em laboratório

Primeiramente, o suco concentrado foi diluído para obter 1L de suco reconstituído de laranja a 10,5°Brix e o açúcar de cana cristal foi misturado em água destilada para obter 1L de solução açucarada também a 10,5°Brix. Com auxílio de uma balança semi-analítica, foram realizadas misturas, em proporções definidas, conforme exemplificado na Tabela 5.

Tabela 5. Mistura entre suco de laranja reconstituído e açúcar de cana.

| Pureza | Produto | Massa (g) | Porcentagem |
|--|---------|-----------|---------------------|
| ^a 100 L | suco | 100 | 100% C ₃ |
| | açúcar | 0 | 0% C ₄ |
| 90 ^b L 10 ^c C | suco | 90 | 90% C ₃ |
| | açúcar | 10 | 10% C ₄ |
| 50 L 50 C | suco | 50 | 50% C ₃ |
| | açúcar | 50 | 50% C ₄ |
| 50 ^d L ₁ 50 ^d L ₂ | suco | 50 | 100% C ₃ |
| | suco | 50 | 0% C ₄ |
| 80 L ₁ 10 L ₂ 10 C | suco | 80 | 90% C ₃ |
| | suco | 10 | 10% C ₄ |
| | açúcar | 10 | |
| 10 L ₁ 60 L ₂ 30 C | suco | 10 | 70% C ₃ |
| | suco | 60 | 30% C ₄ |
| | açúcar | 30 | |
| 10 L ₁ 20 L ₂ 70 C | suco | 10 | 30% C ₃ |
| | suco | 20 | 70% C ₄ |
| | açúcar | 70 | |

^a100 = número antes da letra representa o percentual de mistura do respectivo produto;

^bL = suco de laranja utilizado na formulação da bebida;

^cC = açúcar de cana utilizado na formulação da bebida;

^dL₁ = suco de laranja 1 ($\delta^{13}\text{C}$ -27,98‰) e L₂ = suco de laranja 2 ($\delta^{13}\text{C}$ -26,34‰), utilizados na formulação da bebida.

As análises isotópicas de carbono foram realizadas nos sucos reconstituídos e nas frações de açúcar purificado e na polpa lavada com acetona. Os dados foram utilizados para adequação das equações utilizadas para quantificar a adição de açúcar destas bebidas e, posteriormente, as equações foram utilizadas para quantificar o percentual de C₃ nas bebidas comerciais.

5.3.5. Determinação de adulteração nos sucos comerciais

A mensuração quantitativa foi efetuada pela técnica de diluição isotópica, segundo Ducatti et al. (2002). Esta técnica utiliza isótopos estáveis de um único elemento químico, neste caso, o carbono. A mensuração quantitativa será obtida pelo balanço de massa isotópico, conforme equação 5:

$$\delta a * (C_3) + \delta b * (C_4) = \delta_{\text{produto}} \quad (5)$$

A simbologia empregada na equação (5) significa:

δa e δb = enriquecimento relativo ($\delta^{13}\text{C}$) das fontes de carbono dos padrões de laranjas e açúcar de cana (adimensional);

δ_{produto} = enriquecimento relativo ($\delta^{13}\text{C}$) do produto comercial (adimensional);

C_3 e C_4 = proporções relativas das fontes de laranja e açúcar de cana, para as quais $C_3 + C_4 = 1$.

A equação 5 pode ser desmembrada de duas maneiras distintas. Uma delas, para o cálculo da contribuição relativa da fonte C_3 , considerando a polpa lavada com acetona como o padrão interno de laranja, o açúcar de cana como adulterante e analisando a bebida como um todo (equação 6).

$$\% C_3 = \frac{\delta_{\text{produto}} - \delta_{\text{adulterante}}}{\delta_{\text{polpa}} - \delta_{\text{adulterante}}} * 100 \quad (6)$$

A simbologia empregada na equação (6) significa:

$\% C_3$ = contribuição relativa do carbono de laranja na bebida;

δ_{produto} = enriquecimento relativo isotópico da bebida de laranja (adimensional);

δ_{polpa} = enriquecimento relativo isotópico do padrão interno (adimensional);

$\delta_{\text{adulterante}}$ = enriquecimento relativo isotópico do açúcar de cana (adimensional).

A equação 7 é originária da equação 5, porém é inserido um fator de concentração, que representa a contribuição dos açúcares na constituição dos sólidos solúveis de cada fonte utilizada na formação da bebida.

$$\% C_3 = \frac{B(\delta_{\text{açúcar purificado}} - \delta_{\text{adulterante}})}{[A(\delta_{\text{polpa}} - \delta_{\text{açúcar purificado}})] + [B(\delta_{\text{açúcar purificado}} - \delta_{\text{adulterante}})]} * 100 \quad (7)$$

A simbologia empregada na equação (7) significa:

$\% C_3$ = contribuição relativa do carbono de laranja na bebida;

δ_{polpa} = o enriquecimento relativo isotópico do padrão interno (adimensional);

$\delta_{\text{açúcar purificado}}$ = enriquecimento relativo isotópico do açúcar da bebida de laranja (adimensional);

$\delta_{\text{adulterante}}$ = enriquecimento relativo isotópico do açúcar de cana (adimensional);

A = relação do teor de açúcar da fruta / °Brix da fruta (adimensional);

B = relação do teor de açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana (adimensional).

O princípio da equação (7) é semelhante às relações das misturas isotópicas efetuadas com a razão isotópica $^{87}\text{Sn}/^{86}\text{Sn}$ em água doce e água do mar, no qual, Criss (1999), utilizou das concentrações deste elemento químico, para efetuar as misturas.

5.4. Análises físico-químicas

Para a análise de °Brix, as amostras foram clarificadas em centrífuga de bancada (3500rpm/10 minutos) e a leitura de densidade ($D_{20/20}$) foi feita em densímetro digital. O valor da densidade foi convertido para °Brix através do uso de tabela apropriada.

A determinação da acidez titulável foi feita com NaOH 0,1N, com auxílio de pHmetro (sem fenolftaleína), no pH de 8,3 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995). Os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico anidro / 100mL.

O *ratio* foi determinado por cálculo, conforme equação 4.

A quantificação dos açúcares redutores totais (ART) foi realizada pelo método de Lane-Eynon, utilizando-se solução de Fehling (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995). Os resultados de ART, em função da densidade da amostra, foram transformados para g de glicose / 100g de amostra, a fim de determinar a porcentagem de ART no °Brix do suco.

5.5. Análises energéticas

As análises energéticas foram realizadas nas bebidas comerciais de laranja e determinadas de duas maneiras:

1. bomba calorimétrica;
2. cálculo centesimal.

Na análise em bomba calorimétrica, as amostras foram primeiramente liofilizadas e uma massa aproximada de 1g foi introduzida no aparelho para determinação do seu poder calorífico (1261 *Automatic Isoperibol Bomb Calorimeter – Parr Instrument Company*).

No cálculo, primeiramente foi realizada a análise centesimal de cada amostra das bebidas comerciais (SILVA, 1990), e o valor energético foi calculado utilizando-se fatores de conversão determinados pela ANVISA (BRASIL, 2003).

- Carboidratos – 4kcal/g;
- Proteínas – 4kcal/g;
- Lipídeos – 9kcal/g.

Os resultados das energias obtidos, tanto na bomba calorimétrica quanto no cálculo estequiométrico, foram convertidos para kcal/200mL de amostra, em função do °Brix e densidade de cada amostra. Esta transformação foi realizada para comparar os resultados obtidos a partir das análises em laboratório com os dados energéticos dos rótulos das amostras.

Em seguidas os dados de energia foram convertidos para *Joule* (Sistema Internacional de Medidas), utilizando o fator de 4,1868kJ para 1kcal.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Matéria-prima

A Tabela 6 apresenta os valores do enriquecimento relativo de carbono-13 em relação ao padrão internacional PDB de suco integral e de suco reconstituído de laranja, bem como nas frações: açúcar purificado do suco, polpa lavada com água e polpa lavada com acetona.

Tabela 6. Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em suco de laranja e suas frações.

| SUCO INTEGRAL FRESCO | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-------------|--------------|--------------------------|-------------|-------------------|-------------|----------------------|-------------|------|
| Amostra | Suco | *D.M. | Açúcar Purificado | D.M. | Polpa Água | D.M. | Polpa Acetona | D.M. | |
| 01 | Lima | -28,87 | 0,06 | -28,88 | 0,02 | -28,03 | 0,08 | -27,31 | 0,02 |
| 02 | Hamlin | -28,19 | 0,01 | -28,16 | 0,03 | -29,61 | 0,03 | -28,57 | 0,04 |
| 03 | Pêra | -27,78 | 0,01 | -27,68 | 0,01 | -29,04 | 0,03 | -27,65 | 0,12 |
| 04 | Barão | -27,65 | 0,02 | -27,67 | 0,01 | -28,92 | 0,04 | -27,61 | 0,07 |
| 05 | Hamlin | -27,54 | 0,02 | -27,34 | 0,04 | -28,19 | 0,04 | -27,77 | 0,02 |
| 06 | Pêra | -27,46 | 0,01 | -27,59 | 0,04 | -28,92 | 0,01 | -27,06 | 0,17 |
| 07 | Westin | -27,42 | 0,07 | -27,41 | 0,04 | -28,95 | 0,04 | -27,33 | 0,17 |
| 08 | Lima | -27,19 | 0,02 | -27,56 | 0,02 | -26,63 | 0,09 | -26,01 | 0,06 |
| 09 | Valência | -27,10 | 0,03 | -26,96 | 0,03 | -28,52 | 0,03 | -27,32 | 0,14 |
| 10 | Hamlin | -26,94 | 0,05 | -26,84 | 0,01 | -27,65 | 0,19 | -26,75 | 0,04 |
| 11 | Pêra | -26,81 | 0,04 | -26,90 | 0,05 | -28,06 | 0,00 | -26,60 | 0,04 |
| 12 | Pêra | -26,43 | 0,09 | -26,23 | 0,07 | -28,27 | 0,14 | -26,28 | 0,02 |
| 13 | Natal | -26,16 | 0,04 | -26,04 | 0,04 | -27,64 | 0,03 | -26,20 | 0,12 |
| 14 | Valência | -25,63 | 0,01 | -25,62 | 0,02 | -27,40 | 0,07 | -25,96 | 0,08 |
| 15 | Pêra | -25,03 | 0,01 | -25,02 | 0,05 | -26,34 | 0,04 | -25,01 | 0,02 |
| SUCO RECONSTITUÍDO | | | | | | | | | |
| Amostra | Suco | D.M. | Açúcar Purificado | D.M. | Polpa Água | D.M. | Polpa Acetona | D.M. | |
| 16 | Hamlin | -28,15 | 0,04 | -28,13 | 0,00 | -28,54 | 0,00 | -28,32 | 0,14 |
| 17 | Lima | -27,89 | 0,01 | -27,94 | 0,03 | -27,82 | 0,06 | -27,47 | 0,05 |
| 18 | Lima | -27,71 | 0,01 | -27,80 | 0,01 | -28,41 | 0,05 | -27,60 | 0,03 |
| 19 | Westin | -27,65 | 0,02 | -27,70 | 0,01 | -28,14 | 0,13 | -27,28 | 0,06 |
| 20 | Pêra | -27,59 | 0,06 | -27,61 | 0,02 | -28,30 | 0,02 | -27,29 | 0,02 |
| 21 | Hamlin | -27,23 | 0,03 | -27,10 | 0,02 | -27,85 | 0,02 | -27,05 | 0,08 |
| 22 | Hamlin | -27,17 | 0,02 | -27,00 | 0,01 | -27,89 | 0,10 | -26,76 | 0,13 |
| 23 | Pêra | -27,00 | 0,05 | -26,96 | 0,01 | -27,88 | 0,02 | -26,78 | 0,05 |
| 24 | Pêra | -26,88 | 0,02 | -26,68 | 0,05 | -27,48 | 0,01 | -26,56 | 0,02 |
| 25 | Hamlin | -26,87 | 0,06 | -26,74 | 0,02 | -27,82 | 0,09 | -26,90 | 0,04 |
| 26 | Hamlin | -26,78 | 0,05 | -26,63 | 0,03 | -27,52 | 0,09 | -26,69 | 0,01 |
| 27 | Pêra | -26,66 | 0,07 | -26,76 | 0,07 | -27,38 | 0,03 | -26,25 | 0,01 |
| 28 | Pêra | -26,41 | 0,11 | -26,40 | 0,04 | -27,09 | 0,02 | -26,29 | 0,10 |
| 29 | Pêra | -26,40 | 0,01 | -26,27 | 0,02 | -27,07 | 0,02 | -26,61 | 0,04 |
| 30 | Pêra | -26,36 | 0,03 | -26,25 | 0,02 | -27,50 | 0,02 | -26,49 | 0,18 |
| 31 | Valência | -26,25 | 0,02 | -26,24 | 0,03 | -27,24 | 0,05 | -26,23 | 0,14 |

* D.M. = desvio médio.

Na Tabela 7, estão os resultados do enriquecimento relativo de nitrogênio-15 em relação ao N₂ atmosférico das mesmas amostras.

Tabela 7. Enriquecimento relativo de nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) na polpa lavada com água de suco de laranja.

| SUCO INTEGRAL FRESCO | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------|
| Amostra | Polpa Água | D.M. |
| 01 | Lima | 6,28 |
| 02 | Hamlin | 6,82 |
| 03 | Pêra | 6,79 |
| 04 | Barão | 6,46 |
| 05 | Hamlin | 6,35 |
| 06 | Pêra | 6,32 |
| 07 | Westin | 7,41 |
| 08 | Lima | 7,56 |
| 09 | Valência | 6,32 |
| 10 | Hamlin | 7,41 |
| 11 | Pêra | 5,99 |
| 12 | Pêra | 6,99 |
| 13 | Natal | 6,04 |
| 14 | Valência | 7,73 |
| 15 | Pêra | 6,93 |
| SUCO RECONSTITUÍDO | | |
| Amostra | Polpa Água | D.M. |
| 16 | Hamlin | 6,75 |
| 17 | Lima | 6,33 |
| 18 | Lima | 7,34 |
| 19 | Westin | 7,33 |
| 20 | Pêra | 6,78 |
| 21 | Hamlin | 7,24 |
| 22 | Hamlin | 7,21 |
| 23 | Pêra | 6,79 |
| 24 | Pêra | 7,13 |
| 25 | Hamlin | 7,24 |
| 26 | Hamlin | 6,70 |
| 27 | Pêra | 5,73 |
| 28 | Pêra | 6,38 |
| 29 | Pêra | 7,03 |
| 30 | Pêra | 7,01 |
| 31 | Valência | 6,00 |

Os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para o suco integral de laranja mostraram uma maior variabilidade natural no seu teor isotópico, de -25,03 a -28,87‰, enquanto que o suco reconstituído variou de -26,25 a -28,15‰ (Tabela 6), resultados semelhantes também foram observados para a tangerina (Tabela 8).

A menor variação do teor isotópico no suco concentrado está relacionada com o volume de frutas esmagadas e a mistura de diferentes variedades de laranja para a produção deste suco. Este comportamento da variação do teor isotópico entre suco integral fresco e concentrado também foi constatado por Simpkins et al. (2000).

No presente trabalho, os valores de enriquecimento relativo para carbono do suco e do respectivo açúcar purificado apresentaram pequena variação conforme relatado por Parker (1982), mas para os sólidos insolúveis (polpa lavada com água) esta particularidade não foi observada em todas as amostras. Por exemplo, o teor isotópico da polpa lavada com acetona amostra 12 de suco integral fresco de laranja difere em 2‰ das demais frações e, em 1,25‰ na amostra 31 do suco concentrado (Tabela 6).

Nas amostras de polpa lavada com acetona (Tabela 6), o teor isotópico ficou mais próximo dos sucos e dos respectivos açúcares purificados, exceto para duas amostras de suco integral fresco de laranja lima (16 e 23), que não apresentaram este comportamento.

No caso da tangerina (Tabela 8), todas as amostras de polpa lavada com acetona tiveram seus sinais isotópicos próximos àqueles do suco e do açúcar purificado, mas três amostras de suco integral fresco (34, 36 e 38) não apresentaram esse comportamento.

Os resultados da Tabela 8 apresentam os valores do enriquecimento relativo de carbono-13 em relação ao padrão internacional PDB em suco integral e em suco reconstituído de tangerina, bem como nas frações: açúcar purificado do suco, polpa lavada com água e polpa lavada com acetona. Na Tabela 9, estão os resultados do enriquecimento relativo de nitrogênio-15 em relação ao N₂ atmosférico das mesmas amostras.

Tabela 8. Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em suco de tangerina e suas frações.

| SUCO INTEGRAL FRESCO | | | | | | | | | |
|----------------------|---------|--------|-------------------|--------|------------|--------|---------------|--------|------|
| Amostra | Suco | D.M. | Açúcar Purificado | D.M. | Polpa Água | D.M. | Polpa Acetona | D.M. | |
| 32 | Cravo | -28,11 | 0,13 | -28,03 | 0,03 | -29,43 | 0,04 | -27,68 | 0,05 |
| 33 | Poncã | -27,77 | 0,10 | -27,76 | 0,02 | -29,51 | 0,06 | -27,67 | 0,03 |
| 34 | Murcote | -27,69 | 0,01 | -27,47 | 0,02 | -30,50 | 0,07 | -28,68 | 0,02 |
| 35 | Cravo | -27,48 | 0,06 | -27,61 | 0,05 | -29,02 | 0,16 | -27,64 | 0,08 |
| 36 | Murcote | -27,46 | 0,13 | -28,39 | 0,08 | -29,99 | 0,08 | -29,03 | 0,03 |
| 37 | Poncã | -27,43 | 0,12 | -27,47 | 0,02 | -29,39 | 0,01 | -27,73 | 0,15 |
| 38 | Murcote | -26,62 | 0,04 | -26,49 | 0,06 | -28,24 | 0,00 | -27,21 | 0,04 |

| SUCO RECONSTITUÍDO | | | | | | | | | |
|--------------------|---------|--------|-------------------|--------|------------|--------|---------------|--------|------|
| Amostra | Suco | D.M. | Açúcar Purificado | D.M. | Polpa Água | D.M. | Polpa Acetona | D.M. | |
| 39 | * C M | -28,52 | 0,04 | -28,60 | 0,05 | -29,36 | 0,04 | -28,27 | 0,04 |
| 40 | Poncã | -28,39 | 0,05 | -28,29 | 0,01 | -29,46 | 0,01 | -28,32 | 0,05 |
| 41 | Cravo | -28,19 | 0,01 | -28,28 | 0,02 | -28,75 | 0,06 | -27,75 | 0,13 |
| 42 | C M | -27,93 | 0,03 | -27,78 | 0,06 | -29,36 | 0,13 | -28,12 | 0,03 |
| 43 | C M | -27,84 | 0,05 | -27,76 | 0,05 | -29,39 | 0,02 | -27,92 | 0,11 |
| 44 | Murcote | -27,71 | 0,08 | -27,68 | 0,01 | -29,00 | 0,02 | -27,85 | 0,04 |
| 45 | Murcote | -27,66 | 0,05 | -27,72 | 0,03 | -29,07 | 0,08 | -28,03 | 0,04 |
| 46 | Murcote | -27,07 | 0,01 | -27,10 | 0,01 | -28,09 | 0,09 | -26,81 | 0,07 |

* C M = Cravo e Murcote.

Tabela 9. Enriquecimento relativo de nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) na polpa lavada com água de suco de tangerina.

| SUCO INTEGRAL FRESCO | | | |
|----------------------|------------|------|------|
| Amostra | Polpa Água | D.M. | |
| 32 | Cravo | 6,20 | 0,15 |
| 33 | Poncã | 8,60 | 0,26 |
| 34 | Murcote | 6,24 | 0,04 |
| 35 | Cravo | 5,78 | 0,05 |
| 36 | Murcote | 6,81 | 0,04 |
| 37 | Poncã | 8,06 | 0,03 |
| 38 | Murcote | 6,08 | 0,02 |

| SUCO RECONSTITUÍDO | | | |
|--------------------|-----------------|------|------|
| Amostra | Polpa Água | D.M. | |
| 39 | Cravo e Murcote | 7,15 | 0,01 |
| 40 | Poncã | 7,98 | 0,10 |
| 41 | Cravo | 6,26 | 0,01 |
| 42 | Cravo e Murcote | 7,92 | 0,01 |
| 43 | Cravo e Murcote | 7,94 | 0,02 |
| 44 | Murcote | 7,80 | 0,04 |
| 45 | Murcote | 7,70 | 0,01 |
| 46 | Murcote | 7,06 | 0,06 |

A legislação brasileira proíbe a mistura de suco de tangerina para correção de coloração do suco de laranja (BRASIL, 1997).

A técnica de diluição isotópica com dois isótopos ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) para quantificar a mistura de duas fontes C_3 (PHILLIPS e GREGG, 2003) não pôde ser aplicada neste trabalho, uma vez que os resultados de $\delta^{15}\text{N}$ para os sucos integrais frescos de laranja e tangerina, bem como para os sucos concentrados dessas frutas, apresentaram intervalos de dados muito semelhantes (Figura 2). Isto impossibilitou a aplicação desta técnica, visto que só se poderia utilizar o nitrogênio, caso o teor isotópico na laranja diferísse do teor isotópico na tangerina (Tabelas 7 e 9).

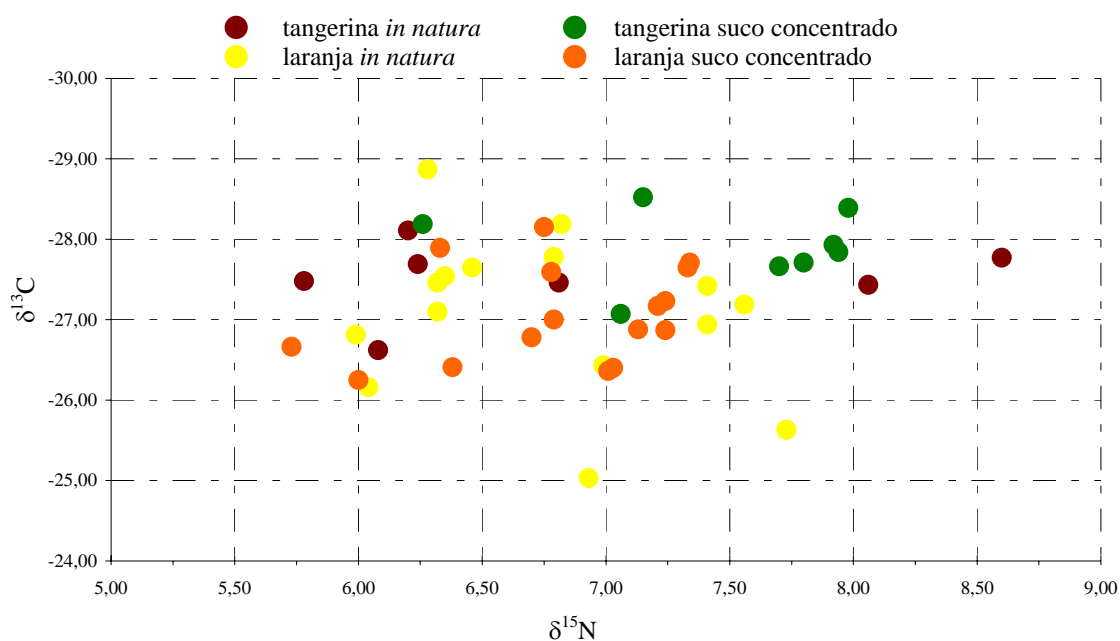


Figura 2. Distribuição do par isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) para sucos integrais frescos e sucos concentrados de laranja e tangerina.

As análises de nitrogênio realizadas nas amostras de tangerina e laranja variaram de +5,73 a +8,60‰ para o enriquecimento relativo de nitrogênio-15, dentro da faixa de $\delta^{15}\text{N}$ citada por Yoneyama (1996), para os solos agricultáveis do Brasil, aproximadamente de +5 a +10‰.

A sobreposição que houve nos sinais isotópicos de nitrogênio, para a laranja e tangerina, pode estar relacionada com o tipo de manejo utilizado nessas culturas. Como são plantas do mesmo gênero, os tratos culturais empregados e os solos onde são cultivadas são semelhantes.

6.2. Ajuste de equações para o cálculo do percentual de pureza (% C₃)

Para quantificar a adição de açúcar de cana no suco de laranja, uma prática comum é determinar um valor fixo do teor isotópico de laranja em função da variação natural de sucos reconhecidamente puros (padrão). Assim, tanto para o suco de laranja como para o açúcar de cana, adota-se o teor isotópico mais pesado ou a média dos dados acrescida de um ou dois desvios padrões.

Então, caso se adote o valor de $\delta_{\text{‰}}^{13}\text{C}$ mais pesado (-25,03‰) como padrão fixo para o suco de laranja e -12,30‰ (Tabela 10) para o açúcar de cana, o suco de laranja mais leve analisado neste trabalho (-28,88‰), teria 130% de fonte C₃, calculado pela equação 5.

Mesmo quando se utiliza o valor médio de todas as amostras acrescido de um desvio padrão para o padrão de laranja, o erro continua alto, da ordem de 20%. Isto pode beneficiar a indústria numa adição maior de açúcar no suco sem que a metodologia pudesse detectá-la. Desta forma, a metodologia seria inviável na detecção deste tipo de fraude.

Como a fixação de um padrão, baseado na variação natural do teor isotópico de carbono da laranja, pode causar erro na quantificação da mistura de açúcar ao suco de laranja, iniciou-se o estudo para utilizar a polpa como um padrão interno da própria bebida.

Tabela 10. Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em açúcar de cana.

| Tipo de açúcar | Média | D.M. |
|-----------------------|--------------|-------------|
| Invertido | -13,57 | 0,13 |
| Cristal | -13,18 | 0,04 |
| Cristal | -13,08 | 0,06 |
| Líquido | -12,93 | 0,11 |
| Cristal | -12,93 | 0,11 |
| Líquido Refinado | -12,88 | 0,02 |
| Cristal | -12,87 | 0,02 |
| Líquido Invertido | -12,79 | 0,01 |
| Líquido | -12,69 | 0,03 |
| Líquido Invertido | -12,69 | 0,01 |
| Líquido | -12,56 | 0,01 |
| Líquido Desodorizado | -12,54 | 0,15 |
| Xarope de Caramelo | -12,51 | 0,06 |
| Líquido Invertido | -12,51 | 0,07 |
| Líquido Invertido | -12,30 | 0,02 |

Nos trabalhos publicados por Rossmann et al. (1997), Rossmann (2001), Koziat et al. (1993), Jamin et al. (1998), Simpkins et al. (2000), Doner (1995), Krueger (1995) Nagy et al., (1995) e Kelly (2003), além de analisar a variação natural do enriquecimento relativo para carbono-13 para suco de fruta, estes autores analisam também um padrão interno do suco (polpa, ácido málico e ácido cítrico) para verificar a autenticidade do mesmo, sem quantificar o açúcar usado na adulteração.

Na Tabela 11, estão apresentados os resultados para o enriquecimento relativo de carbono-13 das amostras de bebidas de laranja produzidas em laboratório (mistura previamente conhecida), para testar a metodologia proposta de quantificação da adição de açúcar ao suco, utilizando a polpa lavada com acetona como padrão interno para o teor isotópico da laranja (equações 6 e 7).

Tabela 11. Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebida de laranja produzida com misturas conhecidas de suco de laranja e açúcar de cana.

| Mistura ^a | Material analisado | Média | D.M. | % C ₃ ^b | % C ₃ ^c | % C ₃ ^d |
|----------------------|--------------------|--------|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 100 L | Bebida | -26,57 | 0,04 | 101 | 100 | 100 |
| | Polpa Acetona | -26,49 | 0,12 | | | |
| | Açúcar Purificado | -26,50 | 0,08 | | | |
| 75 L 25 C | Bebida | -23,17 | 0,13 | 75 | 76 | 74 |
| | Polpa Acetona | -26,53 | 0,16 | | | |
| | Açúcar Purificado | -22,39 | 0,04 | | | |
| 50 L 50 C | Bebida | -19,88 | 0,02 | 51 | 53 | 50 |
| | Polpa Acetona | -26,42 | 0,15 | | | |
| | Açúcar Purificado | -19,03 | 0,01 | | | |
| 25 L 75 C | Bebida | -16,57 | 0,07 | 26 | 28 | 25 |
| | Polpa Acetona | -26,32 | 0,12 | | | |
| | Açúcar Purificado | -15,96 | 0,02 | | | |

^a 100 L (100% laranja); 75 L 25 C (75% laranja 25% açúcar de cana); 50 L 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana) e 25 L 75 C (25% laranja 75% açúcar de cana).

^b Equação 6.

^c Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^d Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

Os valores do enriquecimento isotópico das bebidas preparadas foram usados para o cálculo da percentagem de mistura usando três equações diferentes (equação 6, 7a e 7b).

A equação 6 utiliza a polpa como padrão interno, valor de -13,19‰ para o $\delta^{13}\text{C}$ do açúcar de cana e análise da bebida como um todo. É uma equação precisa, mas a análise da bebida como um todo não é a mais indicada, pois a indústria adiciona outros aditivos (permitidos por lei), como ácido cítrico e vitamina C, que podem falsear o resultado nos produtos comerciais.

Porém para a utilização das equações 7a e 7b, é necessário um fator de correção porque os açúcares da laranja participam com 70 a 80% na composição dos sólidos solúveis da fruta (MACRER et al., 1993).

A concentração de açúcar no suco de laranja varia em função de diversos fatores intrínsecos da fruta (maturação, variedades, etc.). O cálculo da percentagem de participação de suco de laranja pode ficar mais preciso para algumas bebidas, utilizando o fator 0,7 e, em outros casos, 0,8.

Tabela 12. Porcentagem de contribuição dos açúcares na composição dos sólidos solúveis (°Brix) de suco integral fresco e reconstituído de laranja e tangerina.

| | Amostra | | °Brix | g de glicose /100g de amostra | % |
|----|---------------------------|------------------|--------------|--------------------------------------|----------|
| 01 | Tangerina Cravo | <i>in natura</i> | 10,18 | 8,30 | 81,50 |
| 02 | Tangerina Poncã | <i>in natura</i> | 9,99 | 8,24 | 82,48 |
| 03 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | 11,78 | 8,56 | 72,69 |
| 04 | Tangerina Cravo | <i>in natura</i> | 8,65 | 6,48 | 74,88 |
| 05 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | 12,52 | 10,05 | 80,29 |
| 06 | Tangerina Poncã | <i>in natura</i> | 10,28 | 8,46 | 82,27 |
| 07 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | 11,57 | 9,31 | 80,45 |
| 08 | Tangerina Cravo e Murcote | Suco concentrado | 9,87 | 7,33 | 74,30 |
| 09 | Tangerina Poncã | Suco concentrado | 9,79 | 7,76 | 79,22 |
| 10 | Tangerina Cravo | Suco concentrado | 9,18 | 6,93 | 75,53 |
| 11 | Tangerina Cravo e Murcote | Suco concentrado | 9,99 | 7,70 | 77,03 |
| 12 | Tangerina Cravo e Murcote | Suco concentrado | 10,14 | 7,59 | 74,86 |
| 13 | Tangerina Murcote | Suco concentrado | 10,08 | 7,18 | 71,25 |
| 14 | Tangerina Murcote | Suco concentrado | 9,39 | 7,29 | 77,62 |
| 15 | Tangerina Murcote | Suco concentrado | 9,77 | 7,30 | 74,72 |
| 16 | Laranja Lima | <i>in natura</i> | 10,51 | 8,66 | 82,36 |
| 17 | Laranja Hamlin orgânico | <i>in natura</i> | 10,58 | 8,23 | 77,76 |
| 18 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 11,62 | 8,83 | 75,98 |
| 19 | Laranja Barão | <i>in natura</i> | 10,59 | 7,90 | 74,55 |
| 20 | Laranja Hamlin | <i>in natura</i> | 12,13 | 9,67 | 79,72 |
| 21 | Laranja Pêra Olimpia | <i>in natura</i> | 10,31 | 7,71 | 74,73 |
| 22 | Laranja Westin | <i>in natura</i> | 9,12 | 6,80 | 74,55 |
| 23 | Laranja Lima | <i>in natura</i> | 9,65 | 7,51 | 77,85 |
| 24 | Laranja Valência | <i>in natura</i> | 9,09 | 6,70 | 73,74 |
| 25 | Laranja Hamlin | <i>in natura</i> | 10,79 | 8,50 | 78,79 |
| 26 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 10,53 | 7,73 | 73,45 |
| 27 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 10,69 | 8,08 | 75,62 |
| 28 | Laranja Natal | <i>in natura</i> | 10,57 | 7,39 | 69,96 |
| 29 | Laranja Valência | <i>in natura</i> | 10,52 | 8,57 | 81,50 |
| 30 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 9,03 | 7,08 | 78,36 |
| 31 | Laranja Hamlin orgânico | Suco concentrado | 9,83 | 7,79 | 79,20 |
| 32 | Laranja Lima | Suco concentrado | 9,45 | 7,69 | 81,38 |
| 33 | Laranja Lima | Suco concentrado | 9,97 | 7,34 | 73,58 |
| 34 | Laranja Westin | Suco concentrado | 8,75 | 6,63 | 75,76 |
| 35 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 9,93 | 7,26 | 73,07 |
| 36 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 9,57 | 7,60 | 79,36 |
| 37 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 9,80 | 7,67 | 78,24 |
| 38 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 10,00 | 7,68 | 76,76 |
| 39 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 9,65 | 7,64 | 79,22 |
| 40 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 9,22 | 6,97 | 75,56 |
| 41 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 9,55 | 6,87 | 71,96 |
| 42 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 9,80 | 7,80 | 79,61 |
| 43 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 9,24 | 7,04 | 76,14 |
| 44 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 9,73 | 7,71 | 79,22 |
| 45 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 9,14 | 6,85 | 74,93 |
| 46 | Laranja Valência | Suco concentrado | 9,53 | 6,78 | 71,19 |
| | | | | Média | 76,81 |
| | | | | Desvio Padrão | 3,26 |

Os resultados de porcentagem da participação de açúcares na composição do °Brix do suco (Tabela 12) $76,71 \pm 3,26$, são semelhantes aos citados na literatura, da ordem de 70 a 80%. Assim procedendo, estes valores foram utilizados como fatores de correção nas equações 7a e 7b, para os cálculos de quantificação da mistura de açúcar de cana nas bebidas de laranja.

Uma prática comum na indústria para correção de cor e *ratio* das bebidas comerciais é a mistura de duas ou mais variedades de suco de laranja. A Tabela 13 mostra os resultados de algumas misturas de variedades de suco de laranja para produção de bebidas em laboratório.

Tabela 13. Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas de sucos de duas variedades de laranja e açúcar de cana.

| Mistura ^a | Material analisado | Média | D.M. | % C ₃ ^b | % C ₃ ^c | % C ₃ ^d |
|--|--------------------|--------|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 100 L ₁ | Bebida | -27,98 | 0,04 | 100 | 100 | 100 |
| | Polpa Acetona | -27,96 | 0,08 | | | |
| | Açúcar Purificado | -27,98 | 0,02 | | | |
| 50 L ₁ 50 C | Bebida | -20,30 | 0,05 | 48 | 51 | 54 |
| | Polpa Acetona | -28,00 | 0,00 | | | |
| | Açúcar Purificado | -19,95 | 0,05 | | | |
| 100 L ₂ | Bebida | -26,34 | 0,02 | 100 | 98 | 99 |
| | Polpa Acetona | -26,40 | 0,17 | | | |
| | Açúcar Purificado | -26,15 | 0,12 | | | |
| 50 L ₂ 50 C | Bebida | -19,53 | 0,03 | 48 | 51 | 54 |
| | Polpa Acetona | -26,35 | 0,02 | | | |
| | Açúcar Purificado | -19,17 | 0,04 | | | |
| 50 L ₁ 50 L ₂ | Bebida | -27,11 | 0,04 | 100 | 99 | 99 |
| | Polpa Acetona | -27,10 | 0,04 | | | |
| | Açúcar Purificado | -26,94 | 0,07 | | | |
| 70 L ₁ 30 L ₂ | Bebida | -27,45 | 0,00 | 99 | 99 | 99 |
| | Polpa Acetona | -27,62 | 0,06 | | | |
| | Açúcar Purificado | -27,36 | 0,12 | | | |
| 30 L ₁ 70 L ₂ | Bebida | -26,76 | 0,03 | 98 | 100 | 100 |
| | Polpa Acetona | -26,98 | 0,06 | | | |
| | Açúcar Purificado | -26,91 | 0,04 | | | |

^a 100 L₁ (100% laranja); 50 L₁ 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana); 100 L₂ (100% laranja); 50 L₂ 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana); 50 L₁ 50 L₂ (100% laranja); 70 L₁ 30 L₂ (100% laranja); 30 L₁ 70 L₂ (100% laranja); 10 L₁ 80 L₂ 10 C (90% laranja 10% açúcar de cana); 80 L₁ 10 L₂ 10 C (90% laranja 10% açúcar de cana); 60 L₁ 10 L₂ 30 C (70% laranja 30% açúcar de cana); 10 L₁ 60 L₂ 30 C (70% laranja 30% açúcar de cana) e 25 L₁ 25 L₂ 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana).

^b Equação 6.

^c Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^d Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

Tabela 13. Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas de sucos de duas variedades de laranja e açúcar de cana (continuação).

| Mistura ^a | Material analisado | Média | D.M. | % C ₃ ^b | % C ₃ ^c | % C ₃ ^d |
|----------------------|--------------------|--------|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 10 L ₁ | Bebida | -25,20 | 0,03 | | | |
| 80 L ₂ | Polpa Acetona | -26,89 | 0,01 | 88 | 89 | 90 |
| 10 C | Açúcar Purificado | -25,00 | 0,09 | | | |
| 80 L ₁ | Bebida | -26,29 | 0,01 | | | |
| 10 L ₂ | Polpa Acetona | -28,04 | 0,02 | 88 | 88 | 90 |
| 10 C | Açúcar Purificado | -25,92 | 0,00 | | | |
| 60 L ₁ | Bebida | -23,52 | 0,17 | | | |
| 10 L ₂ | Polpa Acetona | -28,02 | 0,06 | 70 | 70 | 73 |
| 30 C | Açúcar Purificado | -22,88 | 0,14 | | | |
| 10 L ₁ | Bebida | -22,52 | 0,01 | | | |
| 60 L ₂ | Polpa Acetona | -26,85 | 0,02 | 68 | 71 | 74 |
| 30 C | Açúcar Purificado | -22,21 | 0,08 | | | |
| 25 L ₁ | Bebida | -20,13 | 0,04 | | | |
| 25 L ₂ | Polpa Acetona | -27,28 | 0,01 | 49 | 48 | 51 |
| 50 C | Açúcar Purificado | -19,20 | 0,02 | | | |

^a 100 L₁ (100% laranja); 50 L₁ 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana); 100 L₂ (100% laranja); 50 L₂ 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana); 50 L₁ 50 L₂ (100% laranja); 70 L₁ 30 L₂ (100% laranja); 30 L₁ 70 L₂ (100% laranja); 10 L₁ 80 L₂ 10 C (90% laranja 10% açúcar de cana); 80 L₁ 10 L₂ 10 C (90% laranja 10% açúcar de cana); 60 L₁ 10 L₂ 30 C (70% laranja 30% açúcar de cana); 10 L₁ 60 L₂ 30 C (70% laranja 30% açúcar de cana) e 25 L₁ 25 L₂ 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana).

^b Equação 6.

^c Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^d Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

A equação 7b utiliza a polpa como padrão interno, valor de -13,19‰ para o $\delta^{13}\text{C}$ do açúcar de cana e análise do açúcar purificado da bebida. Esta condição mostra-se mais indicada para as análises das bebidas comerciais, visto que o açúcar purificado da bebida não tem a interferência dos aditivos usados na produção industrial, conforme mostrado na Tabela 14.

Na mistura de variedades de suco de laranja, estas possuem tanto concentrações de açúcares diferentes em relação ao °Brix, quanto o teor de polpa presente em cada suco, porém o erro na quantificação de C₃ não aumenta numa proporção que comprometa a confiabilidade do emprego dessas equações.

Os dados da Tabela 14 foram explicitados para verificar o comportamento das bebidas fabricadas em laboratório quando adicionado ácido cítrico comercial. No suco de laranja 100 L, a acidez foi corrigida até atingir o *ratio* 7 e na bebida 30 L, a acidez foi corrigida para 0,25g de ácido cítrico/100mL (ambos são valores mínimo e máximo permitidos pela legislação, respectivamente).

Tabela 14. Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas conhecidas de suco de laranja e açúcar de cana e adicionado ácido cítrico.

| Mistura ^a | Material analisado | Média | D.M. | % C ₃ ^b | % C ₃ ^c | % C ₃ ^d |
|----------------------|---------------------|--------|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 100 L | Bebida | -26,32 | 0,09 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,16 | 0,00 | 101 | 99 | 99 |
| | Açúcar Purificado | -26,04 | 0,04 | | | |
| 100 L | Bebida ^e | -24,86 | 0,18 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,16 | 0,00 | 90 | 99 | 99 |
| | Açúcar Purificado | -26,04 | 0,04 | | | |
| 30 L 70 C | Bebida | -17,05 | 0,07 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,20 | 0,05 | 30 | 29 | 32 |
| | Açúcar Purificado | -16,33 | 0,02 | | | |
| 30 L 70 C | Bebida ^e | -16,91 | 0,00 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,20 | 0,05 | 29 | 29 | 32 |
| | Açúcar Purificado | -16,33 | 0,02 | | | |
| | ácido cítrico | -12,26 | 0,04 | | | |

^a 100 L (100% laranja) e 30 L 70 C (30% laranja 70% açúcar de cana).

^b Equação 6.

^c Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^d Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^e adicionado ácido cítrico ao líquido.

No suco de laranja foram adicionados 11,25g de ácido cítrico em 1 litro de amostra para atingir o *ratio* 7. Já, para o refresco de laranja, foi adicionado 0,41g de ácido cítrico em 1 litro de amostra para atingir o limite de 0,25g de ácido cítrico por 100mL de bebida.

Para a equação 6 (Tabela 14), pode-se observar que a maior quantidade de ácido cítrico adicionado no suco interfere na precisão da equação. Porém, quando o ácido é adicionado em pequenas quantidades ao refresco de laranja, a precisão da equação fica resguardada.

Para a equação 7, o ácido adicionado não interferiu nos resultados, visto que o ácido presente na bebida foi eliminado durante a purificação do açúcar da bebida (KOZIET et al., 1993).

As Tabelas 15 e 16 apresentam dados de bebidas produzidas em laboratório com formulações comerciais.

Tabela 15. Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas conhecidas de suco de laranja e açúcar de cana e adicionado ácido cítrico, corante e goma xantana.

| Mistura ^a | Material analisado | Média | D.M. | % C ₃ ^b | % C ₃ ^c | % C ₃ ^d |
|----------------------|---------------------|--------|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 100 L | Bebida | -26,25 | 0,09 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,32 | 0,05 | 99 | 99 | 99 |
| | Açúcar Purificado | -26,12 | 0,07 | | | |
| 90 L 10 C | Bebida | -24,92 | 0,02 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,30 | 0,05 | 90 | 88 | 90 |
| | Açúcar Purificado | -24,42 | 0,03 | | | |
| 70 L 30 C | Bebida ^e | -22,19 | 0,01 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,34 | 0,02 | 69 | 67 | 70 |
| | Açúcar Purificado | -21,26 | 0,05 | | | |
| 50 L 50 C | Bebida ^e | -19,55 | 0,08 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,28 | 0,05 | 49 | 48 | 51 |
| | Açúcar Purificado | -18,67 | 0,10 | | | |
| 30 L 70 C | Bebida ^e | -17,10 | 0,05 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,29 | 0,02 | 31 | 30 | 33 |
| | Açúcar Purificado | -16,38 | 0,02 | | | |
| | açúcar | -13,01 | 0,03 | | | |
| | corante | -22,41 | 0,00 | | | |
| | goma xantana | -26,40 | 0,00 | | | |
| | ácido | -12,07 | 0,14 | | | |

^a 100 L (100% laranja); 90 L 10 C (90% laranja 10% açúcar de cana); 70 L 30 C (70% laranja 30% açúcar de cana); 50 L 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana) e 30 L 70 C (30% laranja 70% açúcar de cana).

^b Equação 6.

^c Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^d Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^e adicionado ácido cítrico, corante e goma xantana ao líquido.

Tabela 16. Análise de $\delta^{13}\text{C}$ em bebidas de laranja produzidas com misturas conhecidas de suco de laranja e açúcar de cana e adicionado ácido cítrico, corante e goma gelana.

| Mistura ^a | Material analisado | Média | D.M. | % C ₃ ^b | % C ₃ ^c | % C ₃ ^d |
|----------------------|---------------------|--------|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 100 L | Bebida | -26,43 | 0,09 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,28 | 0,02 | 101 | 100 | 100 |
| | Açúcar Purificado | -26,23 | 0,07 | | | |
| 90 L 10 C | Bebida | -24,98 | 0,18 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,31 | 0,09 | 90 | 90 | 92 |
| | Açúcar Purificado | -24,76 | 0,09 | | | |
| 70 L 30 C | Bebida ^e | -22,50 | 0,11 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,39 | 0,01 | 71 | 71 | 73 |
| | Açúcar Purificado | -21,80 | 0,20 | | | |
| 50 L 50 C | Bebida ^e | -18,33 | 0,04 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,28 | 0,09 | 41 | 48 | 52 |
| | Açúcar Purificado | -18,67 | 0,11 | | | |
| 30 L 70 C | Bebida ^e | -16,08 | 0,02 | | | |
| | Polpa Acetona | -26,29 | 0,14 | 23 | 29 | 32 |
| | Açúcar Purificado | -16,30 | 0,07 | | | |
| | açúcar | -13,01 | 0,03 | | | |
| | corante | -22,41 | 0,00 | | | |
| | goma gelana | -10,41 | 0,11 | | | |
| | ácido cítrico | -12,07 | 0,14 | | | |

^a 100 L (100% laranja); 90 L 10 C (90% laranja 10% açúcar de cana); 70 L 30 C (70% laranja 30% açúcar de cana); 50 L 50 C (50% laranja 50% açúcar de cana) e 30 L 70 C (30% laranja 70% açúcar de cana).

^b Equação 6.

^c Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^d Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^e adicionado ácido cítrico, corante e goma gelana ao líquido.

Nas formulações comerciais, o tipo de emulsificante utilizado é de escolha da empresa. No caso do emulsificante goma xantana (Tabela 15), as equações 6, 7a e 7b são precisas para quantificar a mistura de açúcar em bebidas de laranja produzidas em laboratório, haja vista que o teor isotópico do emulsificante (-26,40‰) é próximo à bebida (-26,34‰).

Entretanto, o emulsificante goma gelana possui um teor isotópico de carbono-13 mais pesado (-10,41‰) do que o teor isotópico da bebida. A equação 6 neste caso ficou imprecisa nas formulações dos néctares e refresco em que foram adicionados uma quantidade maior do produto (50 L e 30 L), conforme pode ser observado na Tabela 16.

Assim sendo, as equações 7a e 7b mostraram-se as mais indicadas para quantificar a adição de açúcar de cana nas formulações de bebidas comerciais. Isto reforça

nossa intenção de não mensurar precisamente a quantidade exata de suco adicionada na bebida e sim de explicitar intervalos para indicar em que classe de bebida se enquadra o produto.

Nas Tabelas 15 e 16 estão as quatro classes de bebidas previstas pela legislação brasileira: suco de laranja integral ou reconstituído (100 L); suco de laranja reconstituído e adoçado (90 L); néctar de laranja (50 L) e refresco de laranja (30 L).

A legislação brasileira explicita para o néctar de fruta, o percentual de participação de suco de fruta no produto maior do para o refresco (bebida) de fruta, a qual deve apresentar no mínimo 30% de suco de fruta.

Na Tabela 17 estão apresentados dados de % C₃ nas matérias-primas em função das equações propostas para calcular a mistura de açúcar de cana em bebidas comerciais.

Tabela 17. Cálculo de % de C₃ nos sucos puros utilizando as equações propostas do presente trabalho.

| Amostra | | | Suco | Açúcar Purificado | Polpa Acetona | % C ₃ ^a | % C ₃ ^b |
|---------|------------------|------------------|--------|-------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 01 | Laranja Lima | <i>in natura</i> | -28,87 | -28,88 | -27,31 | 108 | 107 |
| 02 | Laranja Hamlin | <i>in natura</i> | -28,19 | -28,16 | -28,57 | 98 | 98 |
| 03 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | -27,78 | -27,68 | -27,65 | 100 | 100 |
| 04 | Laranja Barão | <i>in natura</i> | -27,65 | -27,67 | -27,61 | 100 | 100 |
| 05 | Laranja Hamlin | <i>in natura</i> | -27,54 | -27,34 | -27,77 | 98 | 98 |
| 06 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | -27,46 | -27,59 | -27,06 | 103 | 102 |
| 07 | Laranja Westin | <i>in natura</i> | -27,42 | -27,41 | -27,33 | 100 | 100 |
| 08 | Laranja Lima | <i>in natura</i> | -27,19 | -27,56 | -26,01 | 109 | 108 |
| 09 | Laranja Valência | <i>in natura</i> | -27,10 | -26,96 | -27,32 | 98 | 98 |
| 10 | Laranja Hamlin | <i>in natura</i> | -26,94 | -26,84 | -26,75 | 100 | 100 |
| 11 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | -26,81 | -26,90 | -26,60 | 102 | 101 |
| 12 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | -26,43 | -26,23 | -26,28 | 100 | 100 |
| 13 | Laranja Natal | <i>in natura</i> | -26,16 | -26,04 | -26,20 | 99 | 99 |
| 14 | Laranja Valência | <i>in natura</i> | -25,63 | -25,62 | -25,96 | 98 | 98 |
| 15 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | -25,03 | -25,02 | -25,01 | 100 | 100 |
| 16 | Laranja Hamlin | concentrado | -28,15 | -28,13 | -28,32 | 99 | 99 |
| 17 | Laranja Lima | concentrado | -27,89 | -27,94 | -27,47 | 102 | 102 |
| 18 | Laranja Lima | concentrado | -27,71 | -27,80 | -27,60 | 101 | 101 |
| 19 | Laranja Westin | concentrado | -27,65 | -27,70 | -27,28 | 102 | 102 |
| 20 | Laranja Pêra | concentrado | -27,59 | -27,61 | -27,29 | 102 | 101 |
| 21 | Laranja Hamlin | concentrado | -27,23 | -27,10 | -27,05 | 100 | 100 |
| 22 | Laranja Hamlin | concentrado | -27,17 | -27,00 | -26,76 | 101 | 101 |
| 23 | Laranja Pêra | concentrado | -27,00 | -26,96 | -26,78 | 101 | 101 |

^a Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^b Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

Todas as equações utilizam -12,3‰ para o teor isotópico do açúcar de cana.

Tabela 17. Cálculo de % de C₃ nos sucos puros utilizando as equações propostas do presente trabalho (continuação).

| Amostra | | | Suco | Açúcar Purificado | Polpa Acetona | % C ₃ ^a | % C ₃ ^b |
|---------------|--------------------|------------------|--------|-------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 24 | Laranja Pêra | concentrado | -26,88 | -26,68 | -26,56 | 101 | 101 |
| 25 | Laranja Hamlin | concentrado | -26,87 | -26,74 | -26,90 | 99 | 99 |
| 26 | Laranja Hamlin | concentrado | -26,78 | -26,63 | -26,69 | 100 | 100 |
| 27 | Laranja Pêra | concentrado | -26,66 | -26,76 | -26,25 | 103 | 103 |
| 28 | Laranja Pêra | concentrado | -26,41 | -26,40 | -26,29 | 101 | 101 |
| 29 | Laranja Pêra | concentrado | -26,40 | -26,27 | -26,61 | 98 | 98 |
| 30 | Laranja Pêra | concentrado | -26,36 | -26,25 | -26,49 | 99 | 99 |
| 31 | Laranja Valência | concentrado | -26,25 | -26,24 | -26,23 | 100 | 100 |
| 32 | Tangerina Cravo | <i>in natura</i> | -28,11 | -28,03 | -27,68 | 102 | 102 |
| 33 | Tangerina Poncã | <i>in natura</i> | -27,77 | -27,76 | -27,67 | 100 | 100 |
| 34 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | -27,69 | -27,47 | -28,68 | 94 | 95 |
| 35 | Tangerina Cravo | <i>in natura</i> | -27,48 | -27,61 | -27,64 | 100 | 100 |
| 36 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | -27,46 | -28,39 | -29,03 | 97 | 97 |
| 37 | Tangerina Poncã | <i>in natura</i> | -27,43 | -27,47 | -27,73 | 99 | 99 |
| 38 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | -26,62 | -26,49 | -27,21 | 96 | 97 |
| 39 | T. Cravo e Murcote | concentrado | -28,52 | -28,60 | -28,27 | 102 | 101 |
| 40 | Tangerina Poncã | concentrado | -28,39 | -28,29 | -28,32 | 100 | 100 |
| 41 | Tangerina Cravo | concentrado | -28,19 | -28,28 | -27,75 | 103 | 102 |
| 42 | T. Cravo e Murcote | concentrado | -27,93 | -27,78 | -28,12 | 98 | 98 |
| 43 | T. Cravo e Murcote | concentrado | -27,84 | -27,76 | -27,92 | 99 | 99 |
| 44 | Tangerina Murcote | concentrado | -27,71 | -27,68 | -27,85 | 99 | 99 |
| 45 | Tangerina Murcote | concentrado | -27,66 | -27,72 | -28,03 | 98 | 99 |
| 46 | Tangerina Murcote | concentrado | -27,07 | -27,10 | -26,81 | 102 | 101 |
| Média | | | | | | 100,24 | 100,13 |
| Desvio Padrão | | | | | | 2,60 | 2,25 |

^a Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^b Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

Todas as equações utilizam -12,3‰ para o teor isotópico do açúcar de cana.

De uma maneira geral, pode-se afirmar que as equações para o cálculo da participação de laranja e tangerina nas matérias-primas apresentam um desvio padrão da ordem de 3%. Esta oscilação de 3% para mais ou para menos está relacionada com a variabilidade do teor isotópico do açúcar purificado e da polpa lavada com acetona. E também, com o fator de correção para a concentração do açúcar utilizado na equação.

Conforme anteriormente mencionado, as polpas lavadas com acetona das amostras de tangerina (34, 36 e 38 da Tabela 17) e laranja lima (1 e 8 da Tabela 17), não obedeceram ao comportamento das demais amostras. Nesses casos, a mensuração da % C₃ está imprecisa com erro de cálculo de até 9%. Vale ainda ressaltar que esta inconformidade está presente somente nos sucos integrais frescos. Já para os sucos concentrados isto não foi

observado de maneira tão evidente. Isso pode estar relacionado com que afirmaram Jamin et al. (1998) e Simpkins et al. (2000), o teor isotópico dos sucos integrais frescos e seus componentes apresentam uma maior variabilidade natural em relação aos sucos concentrados.

6.3. Bebidas comerciais

Após a etapa de ajuste da metodologia, as amostras de bebidas comerciais foram analisadas de maneira fracionada (açúcar purificado, polpa lavada com água e polpa lavada com acetona). Amostras de sucos, néctares e refrescos de laranja foram adquiridas no mercado para análise isotópica do carbono (Tabela 18, 19 e 20).

Tabela 18. Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em bebidas comerciais de suco de laranja integral e suas frações.

| Amostra | Rótulo | Bebida | D.M. | Açúcar Purificado | D.M. | Polpa Água | D.M. | Polpa Acetona | D.M. |
|----------------|------------------------|---------------|-------------|--------------------------|-------------|-------------------|-------------|----------------------|-------------|
| 47 | S. de laranja integral | -27,31 | 0,09 | -27,28 | 0,07 | -28,55 | 0,04 | -27,13 | 0,03 |
| 48 | S. de laranja integral | -27,24 | 0,04 | -27,25 | 0,04 | -28,03 | 0,03 | -27,02 | 0,09 |
| 49 | S. de laranja integral | -27,23 | 0,04 | -27,10 | 0,01 | -28,60 | 0,03 | -27,13 | 0,07 |
| 50 | S. de laranja integral | -27,06 | 0,02 | -26,94 | 0,11 | -28,25 | 0,11 | -27,05 | 0,04 |
| 51 | S. de laranja integral | -26,71 | 0,01 | -26,58 | 0,03 | -28,23 | 0,04 | -27,22 | 0,03 |
| 52 | S. de laranja integral | -26,60 | 0,06 | -26,52 | 0,16 | -28,10 | 0,01 | -26,62 | 0,04 |
| 53 | S. de laranja integral | -26,48 | 0,03 | -26,36 | 0,04 | -27,43 | 0,03 | -26,79 | 0,10 |
| 54 | S. de laranja integral | -26,43 | 0,02 | -26,24 | 0,18 | -27,66 | 0,02 | -26,73 | 0,05 |
| 55 | S. de laranja integral | -23,26 | 0,11 | -23,03 | 0,04 | -28,04 | 0,07 | -27,00 | 0,07 |

Tabela 19. Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em bebidas comerciais de suco de laranja e suas frações.

| Amostra | Rótulo | Bebida | D.M. | Açúcar Purificado | D.M. | Polpa Água | D.M. | Polpa Acetona | D.M. |
|---------|------------------------|--------|------|-------------------|------|------------|------|---------------|------|
| 56 | Suco de laranja | -27,50 | 0,04 | -27,55 | 0,01 | -28,67 | 0,04 | -27,31 | 0,02 |
| 57 | Suco de laranja | -27,10 | 0,06 | -26,97 | 0,14 | -28,76 | 0,11 | -27,27 | 0,03 |
| 58 | Suco de laranja | -27,09 | 0,13 | -26,83 | 0,01 | -28,13 | 0,02 | -26,76 | 0,05 |
| 59 | Suco de laranja | -26,86 | 0,04 | -26,64 | 0,10 | -27,96 | 0,15 | -26,88 | 0,00 |
| 60 | S. de laranja orgânico | -26,57 | 0,05 | -26,42 | 0,11 | -27,93 | 0,04 | -26,80 | 0,01 |
| 61 | S. de laranja adoçado | -25,70 | 0,02 | -25,17 | 0,01 | -28,58 | 0,03 | -27,50 | 0,12 |
| 62 | Suco de laranja | -22,27 | 0,11 | -21,97 | 0,01 | -27,91 | 0,05 | -26,53 | 0,02 |
| 63 | S. de laranja adoçado | -21,49 | 0,06 | -20,72 | 0,04 | -28,05 | 0,10 | -27,06 | 0,08 |
| 64 | S. de laranja adoçado | -21,04 | 0,04 | -20,58 | 0,04 | -28,29 | 0,06 | -26,61 | 0,05 |
| 65 | Suco de laranja | -20,75 | 0,01 | -19,90 | 0,07 | -27,48 | 0,01 | -26,64 | 0,04 |
| 66 | S. de laranja adoçado | -20,47 | 0,03 | -19,62 | 0,16 | -28,13 | 0,02 | -26,99 | 0,05 |
| 67 | S. de laranja adoçado | -20,42 | 0,06 | -18,27 | 0,06 | -28,10 | 0,03 | -26,55 | 0,11 |
| 68 | S. de laranja adoçado | -15,20 | 0,03 | -15,13 | 0,05 | -28,26 | 0,04 | -27,23 | 0,01 |

Tabela 20. Enriquecimento relativo de carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em bebidas comerciais de suco concentrado, néctar, refresco de laranja e outros.

| Amostra | Rótulo | Bebida | D.M. | Açúcar Purificado | D.M. | Polpa Água | D.M. | Polpa Acetona | D.M. |
|---------|---------------------|--------|------|-------------------|------|------------|------|---------------|------|
| 69 | S. C. sem açúcar | -26,48 | 0,01 | -26,40 | 0,02 | -27,91 | 0,13 | -26,38 | 0,01 |
| 70 | Suco concentrado | -25,54 | 0,08 | -26,21 | 0,04 | -27,76 | 0,10 | -26,66 | 0,02 |
| 71 | S. C. com açúcar | -19,85 | 0,02 | -19,29 | 0,01 | -27,98 | 0,04 | -26,59 | 0,02 |
| 72 | Néctar de laranja | -20,83 | 0,03 | -19,92 | 0,01 | -28,34 | 0,01 | -27,47 | 0,05 |
| 73 | Néctar de laranja | -18,04 | 0,16 | -17,46 | 0,04 | -28,08 | 0,03 | -26,92 | 0,05 |
| 74 | Néctar de laranja | -17,79 | 0,03 | -17,27 | 0,03 | -27,63 | 0,04 | -26,45 | 0,05 |
| 75 | Refresco de laranja | -18,01 | 0,03 | -17,60 | 0,08 | -28,30 | 0,10 | -27,26 | 0,02 |
| 76 | Frutascítricas | -13,55 | 0,03 | -13,11 | 0,07 | - | - | - | - |
| 77 | Bebida mista | -13,23 | 0,01 | -12,94 | 0,01 | - | - | - | - |
| 78 | R. energético | -13,40 | 0,09 | -13,08 | 0,11 | - | - | - | - |
| 79 | R. energético | -12,18 | 0,01 | -12,98 | 0,03 | - | - | - | - |

Na Tabela 21 estão apresentados os resultados do enriquecimento relativo de nitrogênio-15 para as bebidas de laranja comerciais, análise realizada na fração dos sólidos insolúveis (polpa lavada com água).

Tabela 21. Enriquecimento relativo de nitrogênio-15 ($\delta^{15}\text{N}$) na polpa lavada com água de bebidas de laranja comerciais.

| Amostra | Rótulo | Polpa Água | D.M. |
|----------------|------------------------------|-------------------|-------------|
| 47 | Suco de laranja integral | 8,07 | 0,04 |
| 48 | Suco de laranja integral | 6,44 | 0,01 |
| 49 | Suco de laranja integral | 6,71 | 0,03 |
| 50 | Suco de laranja integral | 5,58 | 0,01 |
| 51 | Suco de laranja integral | 7,10 | 0,02 |
| 52 | Suco de laranja integral | 6,31 | 0,01 |
| 53 | Suco de laranja integral | 6,60 | 0,01 |
| 54 | Suco de laranja integral | 6,59 | 0,01 |
| 55 | Suco de laranja integral | 6,34 | 0,03 |
| 56 | Suco de laranja | 7,34 | 0,04 |
| 57 | Suco de laranja | 6,38 | 0,05 |
| 58 | Suco de laranja | 5,70 | 0,01 |
| 59 | Suco de laranja | 5,95 | 0,04 |
| 60 | Suco de laranja orgânico | 5,33 | 0,04 |
| 61 | Suco de laranja adoçado | 6,70 | 0,04 |
| 62 | Suco de laranja | 6,38 | 0,05 |
| 63 | Suco de laranja adoçado | 5,62 | 0,04 |
| 64 | Suco de laranja adoçado | 8,12 | 0,04 |
| 65 | Suco de laranja | 6,31 | 0,06 |
| 66 | Suco de laranja adoçado | 6,25 | 0,02 |
| 67 | Suco de laranja adoçado | 8,08 | 0,01 |
| 68 | Suco de Laranja adoçado | 7,66 | 0,01 |
| 69 | Suco concentrado. sem açúcar | 6,18 | 0,01 |
| 70 | Suco concentrado | 6,85 | 0,01 |
| 71 | Suco concentrado com açúcar | 6,65 | 0,02 |
| 72 | Néctar de laranja | 5,62 | 0,01 |
| 73 | Néctar de laranja | 8,12 | 0,20 |
| 74 | Néctar de laranja | 5,96 | 0,03 |
| 75 | Refresco de laranja | 5,22 | 0,02 |
| 76 | “Frutas cítricas” | - | - |
| 77 | Bebida mista | - | - |
| 78 | Repositor energético | - | - |
| 79 | Repositor energético | - | - |

Os resultados para $\delta^{15}\text{N}$ das bebidas comerciais variaram de +5,22 a +8,12‰, dados semelhantes ao teor isotópico das matérias primas para o nitrogênio (Figura 3).

Como anteriormente já comentado, o isótopo de nitrogênio não pode diferenciar a mistura com duas fontes C_3 (laranja e tangerina), sendo assim não permite afirmar se a bebida comercial de laranja está misturada com suco de tangerina.

Os rótulos das marcas comerciais (amostras 76, 77, 78 e 79), informam que a bebida é composta de suco concentrado de laranja e tangerina, mas no processamento das amostras não foi possível isolar a fração dos sólidos insolúveis, para análise isotópica do nitrogênio.

As análises de nitrogênio foram realizadas na polpa lavada com água e no caso desta amostras, foram analisados na bebida liofilizada. Mesmo com uma massa 10 vezes maior que a utilizada nas demais amostras, não foi suficiente para detectar a presença de nitrogênio através do espectrômetro de massa.

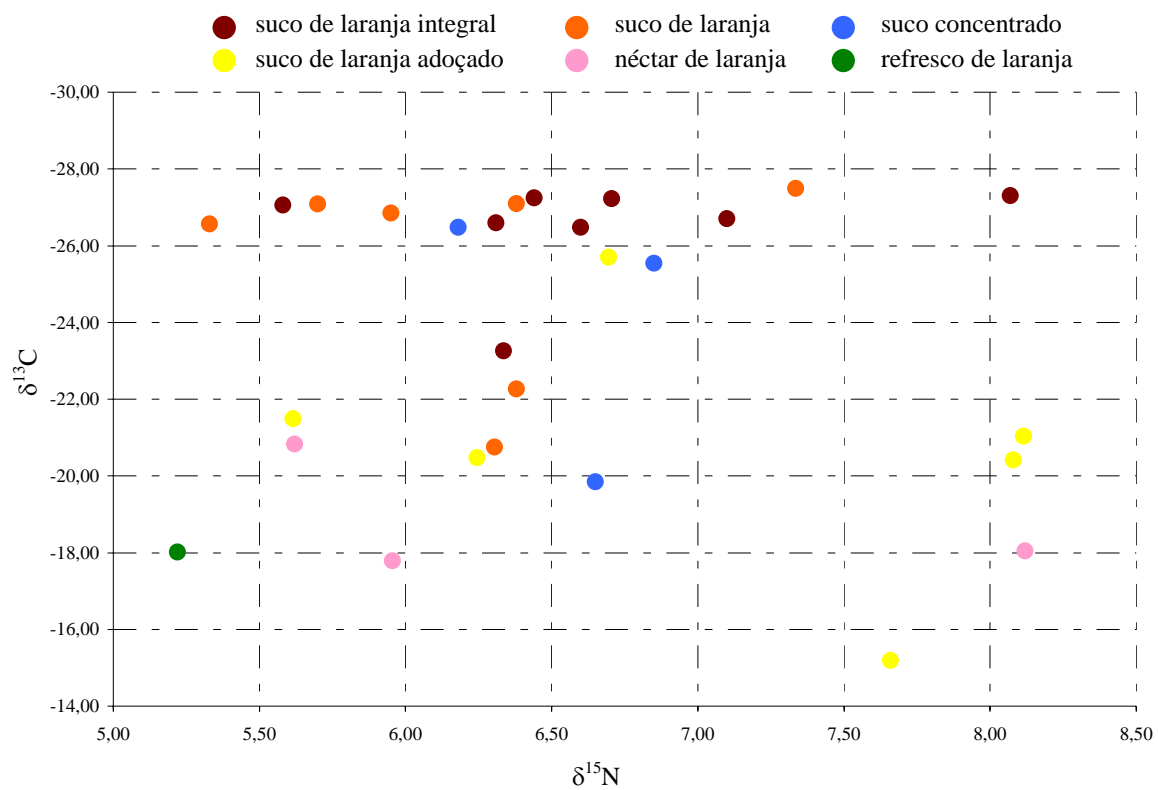


Figura 3. Distribuição do par isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) para bebidas de laranja comerciais.

As Tabelas 22, 23 e 24 apresentam o percentual de C_3 das bebidas comerciais em relação às duas equações propostas para determinar a adição de açúcar de cana.

Tabela 22. Porcentagem de C₃ na composição das bebidas comerciais de suco de laranja integral.

| Amostra | Rótulo | Bebida | Açúcar Purificado | Polpa Acetona | % C ₃ ^a | % C ₃ ^b |
|-----------|---------------------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 47 | Suco de laranja integral | -27,31 | -27,28 | -27,13 | 101 | 101 |
| 48 | Suco de laranja integral | -27,24 | -27,25 | -27,02 | 101 | 101 |
| 49 | Suco de laranja integral | -27,23 | -27,10 | -27,13 | 100 | 100 |
| 50 | Suco de laranja integral | -27,06 | -26,94 | -27,05 | 99 | 99 |
| 51 | Suco de laranja integral | -26,71 | -26,58 | -27,22 | 97 | 97 |
| 52 | Suco de laranja integral | -26,60 | -26,52 | -26,62 | 99 | 100 |
| 53 | Suco de laranja integral | -26,48 | -26,36 | -26,79 | 98 | 98 |
| 54 | Suco de laranja integral | -26,43 | -26,24 | -26,73 | 97 | 98 |
| 55 | Suco de laranja integral | -23,26 | -23,03 | -27,00 | 78 | 80 |

^a Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^b Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

Todas as equações utilizam -12,3‰ para o teor isotópico do açúcar de cana.

Tabela 23. Porcentagem de C₃ na composição das bebidas comerciais de suco de laranja.

| Amostra | Rótulo | Bebida | Açúcar Purificado | Polpa Acetona | % C ₃ ^a | % C ₃ ^b |
|-----------|--------------------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 56 | Suco de laranja | -27,50 | -27,55 | -27,31 | 101 | 101 |
| 57 | Suco de laranja | -27,10 | -26,97 | -27,27 | 98 | 99 |
| 58 | Suco de laranja | -27,09 | -26,83 | -26,76 | 100 | 100 |
| 59 | Suco de laranja | -26,86 | -26,64 | -26,88 | 99 | 99 |
| 60 | Suco de laranja orgânico | -26,57 | -26,42 | -26,80 | 98 | 98 |
| 61 | Suco de laranja adoçado | -25,70 | -25,17 | -27,50 | 88 | 89 |
| 62 | Suco de laranja | -22,27 | -21,97 | -26,53 | 73 | 76 |
| 63 | Suco de laranja adoçado | -21,49 | -20,72 | -27,06 | 63 | 66 |
| 64 | Suco de laranja adoçado | -21,04 | -20,58 | -26,61 | 64 | 67 |
| 65 | Suco de laranja | -20,75 | -19,90 | -26,64 | 59 | 63 |
| 66 | Suco de laranja adoçado | -20,47 | -19,62 | -26,99 | 56 | 60 |
| 67 | Suco de laranja adoçado | -20,42 | -18,27 | -26,55 | 49 | 52 |
| 68 | Suco de laranja adoçado | -15,20 | -15,13 | -27,23 | 24 | 27 |

^a Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^b Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

Todas as equações utilizam -12,3‰ para o teor isotópico do açúcar de cana.

Tabela 24. Porcentagem de C₃ na composição das bebidas comerciais de suco concentrado, néctar, refresco de laranja e outros.

| Amostra | Rótulo | Bebida | Açúcar Purificado | Polpa Acetona | % C ₃ ^a | % C ₃ ^b |
|-----------|--------------------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 69 | S concentrado s/ açúcar | -26,48 | -26,40 | -26,38 | 100 | 100 |
| 70 | Suco concentrado | -25,54 | -26,21 | -26,66 | 98 | 98 |
| 71 | S concentrado c/ açúcar | -19,85 | -19,29 | -26,59 | 56 | 59 |
| 72 | Nectar de laranja | -20,83 | -19,92 | -27,47 | 57 | 60 |
| 73 | Néctar de laranja | -18,04 | -17,46 | -26,92 | 42 | 45 |
| 74 | Néctar de laranja | -17,79 | -17,27 | -26,45 | 42 | 45 |
| 75 | Refresco de laranja | -18,01 | -17,60 | -27,26 | 42 | 45 |
| 76 | “Frutas cítricas” | -13,55 | -13,11 | - | °0 | - |
| 77 | Bebida Mista | -13,23 | -12,94 | - | °0 | - |
| 78 | Repositor energético | -13,40 | -13,08 | - | °0 | - |
| 79 | Repositor energético | -12,18 | -12,98 | - | °0 | - |

^a Equação 7a utiliza o fator 0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^b Equação 7b utiliza o fator 0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta e o fator 1,0 para a relação açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana.

^c Calculado com a equação 5 utilizando $\delta^{13}\text{C}$ -26,47‰, como valor fixo de C₃ e $\delta^{13}\text{C}$ -13,12‰ para C₄.

As equações 7a e 7b utilizam -12,3‰ para o teor isotópico do açúcar de cana.

Em relação ao percentual de C₃ dos sucos integrais de laranja, pode-se afirmar que a maioria destes sucos está em conformidade com seus rótulos. Exceção à amostra 55 que possui adição de açúcar de fonte C₄ em sua composição, o que é proibido para esta categoria de suco de laranja (Tabela 22).

Os sucos de laranja (Tabela 23) na sua maioria não indicam a adição de açúcar apesar de que, as amostra 62 e 65, apresentam um percentual de C₃ de 60 e 75%, dentro do permitido por lei (adição de até 10% de açúcar em relação à massa do produto).

Os sucos de laranja adoçados (Tabela 23) apresentaram um percentual de 52 a 90% de suco de laranja em suas composição, estando em conformidade com a legislação. Neste caso, a lei prevê adição de até 10% de açúcar em relação à massa do produto, ou seja, pode-se praticamente dobrar a massa de sólidos solúveis em função do limite permitido por lei. Exemplificando, 90g de um suco com 10,5°Brix mais 10g de açúcar a 100°Brix obtém-se 100g de uma bebida a 19,45°Brix, isto significa que 49% da massa de sólidos solúveis são oriundos de fonte C₃ e o restante de C₄.

O suco de laranja adoçado da amostra 68, apesar da grande margem para adição de açúcar facultada pela lei brasileira, apresentou apenas 27% de carbono C_3 .

Os sucos concentrados das amostras 69 e 70 estão em conformidade com a legislação, mas o suco concentrado da amostra 71 apresenta aproximadamente 40% de fonte C_4 em sua composição, maior do que os 10% permitidos por lei. Deve-se destacar que para o suco concentrado, a adição de açúcar (10%) deve ser calculada em função do °Brix do suco e não em função de sua massa (Tabela 24).

Os néctares e refrescos de laranja estão em conformidade com a legislação, uma vez que a lei exige que refrescos de frutas devam conter no mínimo 30% de suco de fruta em sua composição e os néctares devem possuir uma concentração de suco de fruta maior do que o refresco de fruta (Tabela 24).

Os repositores energéticos, “frutas cítricas” e bebida mista, apresentaram valores isotópicos muito próximos à cana de açúcar, indicando que a quantidade de suco utilizado na formulação da bebida é inexistente.

Netas bebidas, não foi possível quantificar a participação de fonte C_3 a partir do padrão interno, apesar dos seus rótulos afirmarem a existência de suco concentrado de laranja e tangerina em suas formulações.

Neste caso a mistura foi quantificada utilizando a equação 5 de balanço de massa isotópico, sendo adotado o valor fixo para a fonte C_3 de $\delta^{13}C = -26,34\%$, que é média do teor isotópico dos sucos concentrados acrescido de um desvio padrão (Tabela 8). Para o açúcar de cana utilizou-se o valor de $\delta^{13}C = -13,12\%$, média subtraída de um desvio padrão (Tabela 10).

6.4. Análises físico-químicas

As análises de °Brix, acidez e cálculo de *ratio* para os sucos das matérias-primas e bebidas comerciais de laranja estão apresentadas nas Tabelas 25 e 27.

Tabela 25. Análises físico-químicas de suco integral fresco e concentrado de tangerina e laranja.

| | Amostra | | °Brix | g de ácido cítrico/ 100mL de amostra | Ratio |
|----|---------------------------|------------------|--------------|---|--------------|
| 01 | Laranja Lima | <i>in natura</i> | 10,61 | 0,10 | 110,44 |
| 02 | Laranja Hamlin | <i>in natura</i> | 10,64 | 0,87 | 12,82 |
| 03 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 11,69 | 0,99 | 12,37 |
| 04 | Laranja Barão | <i>in natura</i> | 10,60 | 0,63 | 17,49 |
| 05 | Laranja Hamlin | <i>in natura</i> | 12,22 | 0,65 | 19,72 |
| 06 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 10,31 | 1,20 | 8,97 |
| 07 | Laranja Westin | <i>in natura</i> | 9,24 | 0,93 | 10,33 |
| 08 | Laranja Lima | <i>in natura</i> | 9,62 | 0,05 | 192,71 |
| 09 | Laranja Valência | <i>in natura</i> | 9,18 | 0,95 | 9,98 |
| 10 | Laranja Hamlin | <i>in natura</i> | 10,79 | 0,77 | 14,67 |
| 11 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 10,61 | 0,86 | 12,90 |
| 12 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 10,71 | 0,71 | 15,65 |
| 13 | Laranja Natal | <i>in natura</i> | 10,56 | 1,98 | 5,56 |
| 14 | Laranja Valência | <i>in natura</i> | 10,50 | 1,99 | 5,51 |
| 15 | Laranja Pêra | <i>in natura</i> | 9,05 | 1,17 | 8,04 |
| 16 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 66,80 | 5,65 | 12,32 |
| 17 | Laranja Lima | Suco concentrado | 65,99 | 0,96 | 71,36 |
| 18 | Laranja Lima | Suco concentrado | 66,70 | 1,63 | 42,50 |
| 19 | Laranja Westin | Suco concentrado | 62,30 | 5,18 | 12,52 |
| 20 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 65,27 | 4,06 | 16,70 |
| 21 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 66,07 | 4,21 | 16,32 |
| 22 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 66,06 | 4,16 | 16,50 |
| 23 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 66,67 | 5,46 | 12,70 |
| 24 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 65,70 | 4,24 | 16,10 |
| 25 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 65,69 | 5,11 | 13,37 |
| 26 | Laranja Hamlin | Suco concentrado | 65,42 | 4,26 | 15,97 |
| 27 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 65,43 | 6,21 | 10,94 |
| 28 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 65,24 | 4,28 | 15,84 |
| 29 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 65,59 | 4,04 | 16,87 |
| 30 | Laranja Pêra | Suco concentrado | 65,36 | 4,84 | 14,05 |
| 31 | Laranja Valência | Suco concentrado | 65,49 | 4,73 | 14,39 |
| 32 | Tangerina Cravo | <i>in natura</i> | 10,16 | 0,57 | 18,41 |
| 33 | Tangerina Poncã | <i>in natura</i> | 9,99 | 0,55 | 19,04 |
| 34 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | 12,14 | 1,03 | 12,34 |
| 35 | Tangerina Cravo | <i>in natura</i> | 8,67 | 0,96 | 9,30 |
| 36 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | 12,61 | 0,91 | 14,52 |
| 37 | Tangerina Poncã | <i>in natura</i> | 10,27 | 0,40 | 26,44 |
| 38 | Tangerina Murcote | <i>in natura</i> | 11,60 | 0,69 | 17,53 |
| 39 | Tangerina Cravo e Murcote | Suco concentrado | 65,98 | 4,14 | 16,55 |
| 40 | Tangerina Poncã | Suco concentrado | 65,01 | 4,10 | 16,55 |
| 41 | Tangerina Cravo | Suco concentrado | 66,02 | 5,27 | 12,53 |
| 42 | Tangerina Cravo e Murcote | Suco concentrado | 66,78 | 4,10 | 16,94 |
| 43 | Tangerina Cravo e Murcote | Suco concentrado | 65,43 | 4,10 | 16,59 |
| 44 | Tangerina Murcote | Suco concentrado | 66,48 | 4,64 | 14,89 |
| 45 | Tangerina Murcote | Suco concentrado | 66,09 | 4,61 | 14,90 |
| 46 | Tangerina Murcote | Suco concentrado | 65,68 | 4,53 | 15,08 |

O parâmetro de *ratio* utilizado pela indústria para a determinação do estado de maturação do fruto antes da colheita está apresentado na Tabela 26.

Tabela 26. *Ratio* de variedades de laranjas e tangerinas.

| Variedade | <i>Ratio</i> |
|-------------------|---------------------|
| Tangerina Cravo | 13,0 |
| Tangerina Poncã | 12,0 |
| Tangerina Murcote | 13,0 |
| Laranja Hamilin | 12,5 |
| Laranja Lima | 85,0 |
| Laranja Barão | 16,0 |
| LaranjaPêra | 12,5 |
| Laranja Valência | 11,2 |
| LaranjaWestin | 13,0 |
| Laranja Natal | 12,0 |

Adaptado: FUNDECITRUS, 2004 e QUEIROZ; MENEZES, 2005.

A maioria das amostras de tangerina estava madura, segundo o critério de colheita para a indústria. A amostra 35 (Tabela 21) possui um *ratio* de 9,30 inferior ao ideal para colheita (*ratio* 13,0). Já os sucos concentrados de tangerina possuem valores de *ratio* iguais ou superiores aos dos frutos *in natura* (FUNDECITRUS, 2005).

As laranjas *in natura* apresentaram mais amostras fora do seu estágio ideal de maturação. As amostras 6 e 15 de Laranja Pêra (Tabela 21) apresentaram *ratio* 8,97 e 8,04, sendo que o mínimo para esta variedade é de 12,5. Para a Laranja Valência, o *ratio* indicado é 11,2 e as amostras 9 e 14 apresentaram *ratio* de 9,98 e 5,51. A amostra 13 de Laranja Natal apresentou um *ratio* de 5,56 abaixo do ideal para esta variedade que é 12 (QUEIROZ; MENEZES, 2005).

Tabela 27. Análises físico-químicas de bebidas comerciais de laranja.

| Amostra | Produto | °Brix | g de ácido cítrico/ 100mL de amostra | Ratio |
|---------|------------------------------|-------|---|-------|
| 47 | Suco de laranja integral | 10,79 | 0,62 | 17,48 |
| 48 | Suco de laranja integral | 10,91 | 0,70 | 15,64 |
| 49 | Suco de laranja integral | 10,93 | 0,68 | 16,06 |
| 50 | Suco de laranja integral | 11,10 | 0,72 | 15,44 |
| 51 | Suco de laranja integral | 11,07 | 0,68 | 16,34 |
| 52 | Suco de laranja integral | 11,36 | 0,76 | 14,91 |
| 53 | Suco de laranja integral | 10,86 | 0,69 | 15,77 |
| 54 | Suco de laranja integral | 11,23 | 0,70 | 15,94 |
| 55 | Suco de laranja integral | 10,89 | 0,56 | 19,44 |
| 56 | Suco de laranja | 10,93 | 0,70 | 15,55 |
| 57 | Suco de laranja | 8,93 | 0,82 | 10,95 |
| 58 | Suco de laranja | 11,52 | 0,72 | 15,96 |
| 59 | Suco de laranja | 11,28 | 0,68 | 16,63 |
| 60 | Suco de laranja orgânico | 10,90 | 0,67 | 16,17 |
| 61 | Suco de laranja adoçado | 11,52 | 0,66 | 17,38 |
| 62 | Suco de laranja | 12,34 | 0,57 | 21,70 |
| 63 | Suco de laranja adoçado | 11,19 | 0,58 | 19,46 |
| 64 | Suco de laranja adoçado | 11,22 | 0,54 | 20,97 |
| 65 | Suco de laranja | 11,21 | 0,45 | 24,70 |
| 66 | Suco de laranja adoçado | 10,92 | 0,51 | 21,53 |
| 67 | Suco de laranja adoçado | 12,55 | 0,58 | 21,62 |
| 68 | Suco de Laranja adoçado | 12,54 | 0,61 | 20,59 |
| *69 | Suco concentrado. sem açúcar | 8,75 | 0,56 | 15,58 |
| *70 | Suco concentrado | 7,94 | 0,35 | 22,97 |
| *71 | Suco concentrado com açúcar | 8,87 | 0,34 | 26,37 |
| 72 | Néctar de laranja | 11,63 | 0,55 | 21,33 |
| 73 | Néctar de laranja | 11,54 | 0,44 | 26,17 |
| 74 | Néctar de laranja | 12,96 | 0,43 | 29,96 |
| 75 | Bebida de laranja | 11,05 | 0,55 | 20,23 |
| 76 | “Frutas cítricas” | 11,07 | 0,40 | 27,79 |
| 77 | Bebida mista | 10,92 | 0,40 | 27,43 |
| 78 | Repositor energético | 11,60 | 0,46 | 25,19 |
| 79 | Repositor energético | 10,94 | 0,35 | 31,14 |

* Os sucos concentrados foram diluídos conforme sugerido no rótulo de cada produto

O *ratio* de todas as bebidas comerciais está acima do mínimo exigido na legislação (*ratio* 7).

Os sucos concentrados (amostras 69, 70 e 71), diluídos conforme indicação dos rótulos, bem como a amostra 57 de suco de laranja, apresentaram °Brix abaixo do mínimo exigido pela legislação de suco de laranja que é de 10,5 °Brix (BRASIL, 1997).

6.5. Análises energéticas

Na Tabela 28, estão apresentados os resultados da análise centesimal realizadas nas bebidas comerciais para o cálculo do valor energético de cada bebida.

Tabela 28. Análise centesimal das bebidas comerciais de laranja com base de matéria seca.

| Amostra | Produto | Carboidrato | Proteína | Lipídeos | Minerais |
|----------------|------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 47 | Suco de laranja integral | 90,31 | 6,50 | 0,88 | 3,20 |
| 48 | Suco de laranja integral | 89,95 | 6,48 | 0,82 | 2,56 |
| 49 | Suco de laranja integral | 89,06 | 7,27 | 0,93 | 3,25 |
| 50 | Suco de laranja integral | 90,30 | 6,62 | 0,83 | 2,43 |
| 51 | Suco de laranja integral | 90,58 | 5,48 | 0,56 | 2,88 |
| 52 | Suco de laranja integral | 87,99 | 5,99 | 0,86 | 3,97 |
| 53 | Suco de laranja integral | 88,78 | 6,95 | 0,86 | 2,73 |
| 54 | Suco de laranja integral | 88,99 | 6,71 | 0,93 | 2,59 |
| 55 | Suco de laranja integral | 89,63 | 6,56 | 0,94 | 2,35 |
| 56 | Suco de laranja | 89,93 | 6,83 | 0,85 | 3,24 |
| 57 | Suco de laranja | 88,72 | 6,00 | 0,97 | 4,36 |
| 58 | Suco de laranja | 88,75 | 6,66 | 0,84 | 3,37 |
| 59 | Suco de laranja | 89,42 | 6,75 | 0,89 | 2,64 |
| 60 | Suco de laranja orgânico | 88,55 | 6,68 | 0,56 | 3,30 |
| 61 | Suco de laranja adoçado | 90,43 | 6,34 | 0,92 | 2,15 |
| 62 | Suco de laranja | 90,92 | 7,01 | 0,75 | 2,25 |
| 63 | Suco de laranja adoçado | 92,26 | 4,08 | 0,63 | 2,76 |
| 64 | Suco de laranja adoçado | 91,72 | 5,55 | 0,51 | 1,74 |
| 65 | Suco de laranja | 90,42 | 6,43 | 0,51 | 2,61 |
| 66 | Suco de laranja adoçado | 90,77 | 6,33 | 0,71 | 2,38 |
| 67 | Suco de laranja adoçado | 91,52 | 4,89 | 0,54 | 1,95 |
| 68 | Suco de Laranja adoçado | 90,99 | 4,91 | 0,68 | 1,98 |
| *69 | Suco concentrado. sem açúcar | 90,86 | 5,01 | 0,77 | 2,81 |
| *70 | Suco concentrado | 91,96 | 5,12 | 0,52 | 2,80 |
| *71 | Suco concentrado com açúcar | 89,68 | 5,86 | 0,75 | 2,38 |
| 72 | Néctar de laranja | 91,16 | 5,84 | 0,64 | 1,94 |
| 73 | Néctar de laranja | 91,46 | 5,27 | 0,77 | 2,97 |
| 74 | Néctar de laranja | 91,39 | 5,04 | 0,83 | 2,80 |
| 75 | Bebida de laranja | 91,15 | 5,12 | 1,02 | 1,62 |
| 76 | “Frutas cítricas” | 97,44 | 1,17 | 0,83 | 0,18 |
| 77 | Bebida mista | 96,82 | 0,44 | 0,79 | 0,65 |
| 78 | Repositor energético | 97,28 | 0,40 | 0,88 | 0,33 |
| 79 | Repositor energético | 97,13 | 0,48 | 0,60 | 0,77 |

* Os sucos concentrados foram diluídos conforme sugerido no rótulo de cada produto.

Tabela 29. Valores energéticos expressos nos rótulos das bebidas comerciais e determinados por bomba calorimétrica e cálculo centesimal.

| Amostra | Produto | Valor energético / 200mL | | | | | |
|---------|------------------------------|--------------------------|-----|---------|-----|--------|-----|
| | | Bomba | | Cálculo | | Rótulo | |
| | | kcal | kJ | kcal | kJ | kcal | kJ |
| 47 | Suco de laranja integral | 73 | 305 | 82 | 342 | 110 | 461 |
| 48 | Suco de laranja integral | 72 | 303 | 82 | 344 | 80 | 335 |
| 49 | Suco de laranja integral | 73 | 305 | 82 | 345 | 80 | 335 |
| 50 | Suco de laranja integral | 75 | 313 | 84 | 352 | 80 | 335 |
| 51 | Suco de laranja integral | 73 | 305 | 83 | 345 | 90 | 377 |
| 52 | Suco de laranja integral | 77 | 322 | 83 | 349 | 80 | 335 |
| 53 | Suco de laranja integral | 74 | 310 | 81 | 340 | 80 | 335 |
| 54 | Suco de laranja integral | 77 | 322 | 84 | 352 | 80 | 335 |
| 55 | Suco de laranja integral | 72 | 304 | 82 | 344 | 60 | 251 |
| 56 | Suco de laranja | 72 | 300 | 83 | 346 | 80 | 335 |
| +57 | Suco de laranja | 58 | 245 | 67 | 280 | - | - |
| 58 | Suco de laranja | 77 | 323 | 86 | 359 | 80 | 335 |
| 59 | Suco de laranja | 75 | 315 | 85 | 355 | 80 | 335 |
| 60 | Suco de laranja orgânico | 72 | 303 | 81 | 338 | 90 | 377 |
| 61 | Suco de laranja adoçado | 77 | 323 | 87 | 364 | 96 | 402 |
| 62 | Suco de laranja | 84 | 351 | 94 | 392 | 80 | 335 |
| 63 | Suco de laranja adoçado | 76 | 317 | 84 | 351 | 90 | 377 |
| 64 | Suco de laranja adoçado | 76 | 318 | 85 | 354 | 90 | 377 |
| 65 | Suco de laranja | 75 | 312 | 84 | 352 | 100 | 419 |
| 66 | Suco de laranja adoçado | 72 | 300 | 83 | 346 | 90 | 377 |
| 67 | Suco de laranja adoçado | 84 | 350 | 93 | 391 | 90 | 377 |
| 68 | Suco de Laranja adoçado | 83 | 349 | 93 | 389 | 100 | 419 |
| +*69 | Suco concentrado. sem açúcar | 59 | 248 | 66 | 276 | - | - |
| *70 | Suco concentrado | 50 | 209 | 60 | 253 | 50 | 209 |
| *71 | Suco concentrado com açúcar | 61 | 253 | 67 | 279 | 88 | 368 |
| 72 | Néctar de laranja | 80 | 333 | 87 | 366 | 100 | 419 |
| 73 | Néctar de laranja | 78 | 327 | 87 | 364 | 110 | 461 |
| 74 | Néctar de laranja | 87 | 365 | 97 | 405 | 110 | 461 |
| 75 | Bebida de laranja | 74 | 310 | 83 | 349 | 100 | 419 |
| 76 | “Frutas cítricas” | 75 | 315 | 85 | 357 | 40 | 167 |
| 77 | Bebida mista | 74 | 309 | 83 | 347 | 82 | 343 |
| 78 | Repositor energético | 78 | 327 | 88 | 370 | 110 | 461 |
| 79 | Repositor energético | 72 | 303 | 83 | 347 | 92 | 385 |
| | Média | 74 | 309 | 83 | 347 | 88 | 366 |
| | Desvio Padrão | 7 | 31 | 8 | 33 | 15 | 66 |

* Os sucos concentrados foram diluídos conforme sugerido no rótulo de cada produto.

+ Sem informações nutricionais no rótulo.

Os resultados do valor energético das bebidas comerciais de laranja possuem variações devido às diferenças metodológicas utilizadas para a determinação do conteúdo energético. Comparando-se os resultados dos valores energéticos obtidos pela bomba calorimétrica mostraram-se inferiores aos valores determinados por cálculo e, também são na sua maioria inferiores aos informados nos rótulos.

O valor energético informado no rótulo geralmente é obtido em tabelas de composição de alimentos. Os dados destas tabelas produzidas no Brasil, ou mesmo no exterior, são pouco confiáveis por falta de descrição dos procedimentos analíticos utilizados, dos critérios e forma de amostragem (PHILIPPI et al., 1995).

A padronização de metodologia analítica adotada também é outro fator importante a ser considerado quando se deseja comparar resultados; nos rótulos não se encontra menção das tabelas consultadas e, por sua vez, à metodologia utilizada.

Muitos autores condenam a determinação das informações nutricionais através de tabelas de composição de alimento. Além de serem diferentes entre si para um mesmo alimento, influenciam no cálculo energético, não consideram variações que as matérias primas podem sofrer ao longo do ano (PEDROSA et al., 1994)

A abordagem mais adequada para se obter o valor energético de alimentos é a calorimetria direta, a qual permite a determinação precisa do conteúdo energético, por meio da combustão completa do alimento (TANNUS et al., 2001).

6.6. Considerações finais

A metodologia de análise das razões isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ mensuradas por espectrometria de massa desenvolvida nesta pesquisa (equação de balanço de massa isotópico com padrão interno associada à contribuição dos açúcares na constituição dos sólidos solúveis) pode também ser aplicada a outros tipos de sucos de frutas desde que possuam polpa em sua composição e seja conhecido o percentual da contribuição de açúcares na composição de sólidos solúveis.

As bebidas de frutas que possuem polpa (padrão interno) em sua composição e que poderiam ser analisados por essa metodologia são:

- tangerina;

- manga;
- maracujá;
- pêssego;
- pêra;
- goiaba;
- caju;
- maçã;
- acerola.

7. CONCLUSÕES

Na análise isotópica de bebidas de laranja, com vistas a detecção de fraudes, o uso de um padrão interno (polpa) melhora a confiabilidade do método.

O uso das equações 7a (0,8 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta) e 7b (0,7 para a relação açúcar da fruta / °Brix da fruta) são as equações mais adequadas para detectar o percentual de fonte C₃ no suco de laranja.

Das 29 marcas de bebidas de laranja (sucos, néctares e refresco), apenas três marcas estavam adulteradas.

O isótopo de nitrogênio-15 não é indicado para quantificar a mistura de suco de laranja com suco de tangerina.

As marcas de repositores energéticos, bebida mista e “frutas cítricas” não apresentaram polpa em sua composição. O balanço de massa isotópico simples mostrou a ausência de fonte C₃ nessas bebidas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CITRUS. Mercado de suco de laranja por região. 2003. Disponível em <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: 05 jul. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16.ed. Washington, D.C. 1995. v. 2.

BARRIE, A.; PROSSER, S. Automated analysis of light element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S. **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. cap. 1, p.1-46.

BLACKBURN, T. H.; KNOWLES R. Introduction. In: KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H. **Nitrogen isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 1, p. 1-10.

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. (Ed.) **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. cap. 2, p. 47-82.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of natural materials: I. sample preparation and mass spectrometric analysis. In: COLEMAN, D. C.; FRY, B. **Carbon isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1991a. cap. 10, p. 155-171.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of natural materials: II. sample preparation and mass spectrometric analysis. In: COLEMAN, D. C.; FRY, B. **Carbon isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1991b. cap. 11, p. 173-185.

BOUTTON, T. W. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ fractionation and its utility in terrestrial plant studies. In: COLEMAN, D. C.; FRY, B. **Carbon isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1991c. cap. 12, p. 186-200.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/php/home.php>>. Acesso em: 16 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997. Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 de setembro de 1997. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=list&back=>>>. Acesso em: 05 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Portaria nº 544, de 16 de novembro de 1998. Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade, para refresco, refrigerante,

preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 de novembro de 1998. Disponível em:

<<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=list&back=>>. Acesso em: 05 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução normativa nº 12, de 10 de setembro de 1999. Padrões de Identidade e Qualidade para Polpas de Frutas, Sucos Tropicais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 de setembro de 1999. Disponível em:

<<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=list&back=>>. Acesso em: 05 set. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto nº 3510, de 16 de junho de 2000. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de junho de 2000. Disponível em:

<<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=list&back=>>. Acesso em: 05 set. 2005.

CHEN, C. S.; SHAW, P. E.; PARISH, M. E. Orange and Tangerine Juices. In: NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. **Fruit juice processing technology**. Florida: Agscience, 1993. cap. 5, p. 110-165.

CONTREIRAS, J. **Fisiologia e bioquímica da respiração das plantas superiores**. Lisboa: Calouste Gulbenkain, 1992. 312p.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and corrections factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochemistry Cosmochimica Acta**, v. 12, p. 133-149, 1957.

CRISS, R. E. **Principles of stable isotope distribution**. New York: Oxford University Press, 1999 254 p.

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. et al. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, v. 59, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análise da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em matéria orgânica e das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 51, n.2, p. 275-286, 1979.

FARQUHAR, G. D. On the nature of carbon isotope discrimination in C_4 species. **Austrian Journal Plant Physiology**, v. 10, p. 205-226, 1983.

FARQUHAR, G. D.; O'LEARY, M. H.; BERRY, J. A. On the relationship between carbon isotope discrimination and intercellular carbon dioxide concentration in leaves. **Austrian Journal Plant Physiology**, v. 9, p. 121-137, 1982.

FRITZ, P.; FONTES, J. C. Isotope and food. In MARCEL, G. H. **HandBook of environmental isotope geochemistry**. Tokyo: Elsevier, 1986. v.2, cap. 12, p. 507-548.

FUNDAÇÃO DE DEFESA DA CITRICULTURA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

Industrialização da laranja. Disponível em < <http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: 15 jul. 2005.

GIMÉNEZ-MIRALES, J. E.; SALAZAR, D. M.; SOLANA, I. Regional origin assignment of red wines from valencia (Spain) by ^2H NMR and ^{13}C IRMS stable isotope analysis of fermentative ethanol. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p. 2645-2652, 1999.

GOH, K. M.; HAYNES, R. J. Nitrogen and Agronomic Practice. In: HAYNES, R. J. **Mineral nitrogen in the plant-soil system**, Madison: Academic Press, 1986. cap.7, p. 379-468.

GUILLOU, C. et al. Determination of the ^{13}C contents of organic acids and sugars in fruit juices: inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**, v. 388, p. 137-143, 1999.

GUILLOU, C. et al. Use of pyrolysis-mass spectrometry in food analysis: applications in the food analysis laboratory of the European Commissions' Joint Research Centre. **Journal Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 49, p. 329-335, 1998.

HANDLEY, L. L.; RAVEN, J. A. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. **Plant, Cell and Environment**, v. 15, p. 965-985, 1992.

HAYNES, R. J. Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In: HAYNES, R. J. **Mineral nitrogen in the plant-soil system**. Madison: Academic Press, 1986. cap. 6, p. 303-378.

HENDRIX, C. M.; REDD, J. B. Chemistry and technology of citrus juices and by-products. In: ASHURST, P. R. **Production and packaging of non-carbonates fruit juices and fruit beverages**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. cap. 2, p. 53-87.

JAMIN, E. et al. Measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of sugars, malic acid, and citric acid as authenticity probes of citrus juices and concentrates. **Journal of AOAC International**, v. 81, p. 604-609, 1998.

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.; ROSSMANN, A.; MARTIN, G. J. Determination of the ^{13}C contents of sugars of fruit and vegetables juices: inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**, v. 271, 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: Marcel Decker, 1995. cap. 7, p. 109-124.

LARANJA BRASIL. Suco de laranja que não é suco de laranja, 2003. Disponível em <<http://www.laranjabrasil.com.br>>. Acesso em: 05 mai. 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Biossíntese de carboidrato. In: SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. cap. 19, p. 444-476.

MACRER, R.; ROBINSON, R. K.; SADLER, M. J. Citrus fruits. In: MACRER, R.; ROBINSON, R. K.; SADLER, M. J. **Encyclopedia of food science, food technology, and nutrition**. San Diego: Academic Press Inc., 1993. vol. 2, p. 994-1023.

MORTON, R. L.; QUIGGIN, D.; HIGGINS, T. J. V. Regulation of seed storage protein gene expression. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. cap. 5, p. 103-138.

MULVANEY, R. L. Mass spectrometry. In: KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H. **Nitrogen isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 2, p. 11-58.

NAGY, S.; ATTAWAY, J. A.; RHODES, M. E. **Adulteration of fruit juice beverage**. 2. ed. New York: Marcel Decker, 1995. 663 p.

O'LEARY, M. H. Biochemical basis of carbon isotope fractionation. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. San Diego: Academic Press, 1992. cap. 3, p. 19-26.

PEDROSA, L. F. C. et al. Análise química de preparações usuais em cardápios populares brasileiros. **Revista de Nutrição da Puccamp**, v. 7, n. 1, p. 48-61, 1994.

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

PHILIPPI, S. T.; RIGO, N.; LORENZANO, C. Estudo comparativo entre tabelas de composição química de alimentos para avaliação de dietas. **Revista de Nutrição da Puccamp**, v.8, n. 2, p. 200-213, 1995.

PHILLIPS, D. L.; GREGG, J. W. Source partitioning using stable isotope: coping with too many sources. **Oecologia**, v. 136, p. 261-269, 2003.

QUEIROZ, E. C.; MENEZES, H. C. Suco de Laranja. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 11, p. 221-254.

ROSSI, N. F. et al. Análise da adulteração de méis por açúcares comerciais utilizado-se a composição isotópica de carbono. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 199-204, 1999.

ROSSMANN, A. et al. 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**, v. 340, p. 21-29, 1997.

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

SHEARER, G.; KOHL, D. H. Natural Abundance of N: Fractional contribution of two sources to a common sink and use isotope discrimination. In: KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H. **Nitrogen isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1993. cap.4, p. 89-126.

SILVA, D. J. **Análises de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 165p.

SIMPKINS, W. A. et al. Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. **Food Chemistry**, v. 70, p. 385-390, 2000.

TANNUS, A. F. S. et al. Determinação do valor energético por calorimetria direta de alguns alimentos consumidos por crianças e adolescentes. **Revista de Nutrição da Puccamp**, v. 14, n. 3, p. 231-233, 2001.

USDA. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. Nutrient Database for Standard Reference, Release 13. Disponível em <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/>>. Acesso em: 22 ago. 2005.

USP. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Tabela brasileira de composição de alimentos, Revisada em 2005. Disponível em <<http://www.fcf.usp.br/tabela/>>. Acesso em: 22 ago 2005.

VERKOUTEREN, R. M. Strategies and practicalities in the production and use of gas standard materials. In: GROOT, P. A. **Handbook of stable isotope analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 2004. cap. 43, p. 944-956.

WAREMBOURG, F. R. Nitrogen fixation in soil and plant systems. In: KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H. **Nitrogen isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 5, p. 127-156.

YONEYAMA, T. Characterization of natural ^{15}N Abundance of Soils. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S-I. **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. cap. 8, p. 205-224.

YONEYAMA, T. et al. Discrimination of nitrogen isotopes during absorption of ammonium and nitrate at different nitrogen concentrations by rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 133-139, 2001.