



ANÁLISE ISOTÓPICA DO CARBONO EM NÉCTARES DE CAJU*

Ricardo FIGUEIRA**

Andressa Milene Parente NOGUEIRA***

Waldemar Gastoni VENTURINI FILHO****

Carlos DUCATTI*****

Martha Maria MISCHAN*****

■ **RESUMO:** Os objetivos deste trabalho foram determinar a composição isotópica de néctares comerciais de caju e, por meio de modelos de mistura, quantificar a porcentagem de carbono proveniente de plantas do ciclo fotossintético C_3 , a fim de identificar as bebidas que não estavam em conformidade com as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para isso, foram produzidos néctares em laboratório conforme a legislação brasileira. Também foi produzida bebida adulterada com quantidade de polpa de caju abaixo do limite estabelecido. Nesses néctares, as porcentagens teóricas de fonte C_3 foram calculadas por meio do balanço de massa de sólidos solúveis. Para a análise isotópica foram mensurados os valores isotópicos dos açúcares de cana, dos néctares de caju e de suas frações açúcares purificados e sólidos insolúveis. Com esses valores, foram calculadas as porcentagens práticas de fonte C_3 (reais) por meio da análise isotópica, em espectrômetro de massa. Os resultados práticos foram comparados com os teóricos para definir a melhor forma de quantificação de fonte C_3 . Para identificar os néctares comerciais adulterados, foi desenvolvido um limite de legalidade conforme a legislação brasileira. Quatro marcas de néctares de caju foram analisadas e todas classificadas como legais. O limite de legalidade possibilitou identificar as bebidas em conformidade com a lei. A metodologia foi eficiente para quantificar o carbono de origem C_3 em néctares comerciais de caju.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** Bebidas; adulteração; qualidade; carbono-13; IRMS; *Anacardium occidentale*.

INTRODUÇÃO

Num mercado altamente competitivo, as indústrias de bebidas apostam na diversificação da linha de produtos. Dentre estas novidades, o néctar de fruta vem ganhando es-

paço junto aos consumidores, em razão do seu menor custo quando comparado aos sucos integrais.

O néctar de caju (*Anacardium occidentale*, L.) é definido como a bebida não fermentada, obtida da dissolução em água potável da parte comestível do caju e açúcares, destinado ao consumo direto, podendo ser adicionado de ácidos. O Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) determina que o néctar de caju deve ser produzido com, no mínimo, 15% de suco ou polpa (m/m) e teor de sólidos solúveis maior ou igual a 10 °Brix.³

O suco de caju integral é a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível do pedúnculo do caju, através de processo tecnológico adequado.² A designação "integral" será privativa do suco sem adição de açúcar e na sua concentração natural.⁴

Já a polpa de caju é o produto não fermentado e não diluído, obtido do pedúnculo do caju, através de processo tecnológico adequado. De acordo com o PIQ, o teor de sólidos solúveis da polpa de caju deve ser maior ou igual a 10 °Brix.²

A adulteração de néctares de caju pode ocorrer pela adição de suco ou polpa abaixo dos valores mínimos estabelecidos por lei (<15%). Através do PIQ, laboratórios de análise podem estimar a quantidade de matéria-prima usada na fabricação dessas bebidas. A técnica dos isótopos estáveis tem sido utilizada como ferramenta de controle de qualidade nas indústrias de alimentos e bebidas, bem como nas instituições oficiais de fiscalização como instrumento de autuação de produtos fraudados,¹⁰ baseando-se nos diferentes metabolismos fotossintéticos de plantas C_3 e C_4 .

As plantas apresentam uma abundância ou assinatura isotópica de carbono que varia, basicamente, de acordo com o modo de fixação do CO_2 atmosférico durante seus ciclos fotossintéticos. As duas principais vias bioquímicas para a fixação de carbono são as de plantas com o ciclo fotossintético de Calvin-Benson (denominado C_3) e de

* Trabalho elaborado com apoio financeiro do CNPq (Processo n. 505031/2008-6) e FAPESP (Processo 2009/51661-1).

** Programa de Pós-Graduação em Energia na Agricultura – Curso de Doutorado – Centro de Isótopos Estáveis Ambientais – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista – UNESP – 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil. E-mail: ricardofigueira@hotmail.com.

*** Programa de Pós-Graduação em Energia na Agricultura – Curso de Mestrado – Laboratório de Bebidas – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP – 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil.

**** Laboratório de Bebidas – Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP – 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil.

***** Centro de Isótopos Estáveis Ambientais – Instituto de Biociências – UNESP – 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil.

***** Departamento de Bioestatística – Instituto de Biociências – UNESP – 18618-000 – Botucatu – SP – Brasil.

Hatch-Slack (denominado C_4). Todas as espécies de plantas C_3 (caju, uva, maçã, pêssago, etc.) reduzem o CO_2 para fosfoglicerato (um composto de três carbonos) através da enzima RuBP-carboxilase. Esta enzima discrimina o $^{13}CO_2$, resultando em valores de $\delta^{13}C$ em torno de -27‰. Já as espécies do ciclo C_4 (cana-de-açúcar, milho e sorgo) reduzem o CO_2 a ácido aspártico ou ácido málico (ambos compostos com quatro carbonos), através da enzima PEP-carboxilase. Esta enzima não discrimina o ^{13}C como a RuBP-carboxilase, apresentando valor médio de -13‰.¹⁵ Essa diferença entre plantas C_3 e C_4 também é encontrada nos seus produtos e derivados, podendo assim determinar com precisão qual a origem do carbono.¹⁶

Quando duas fontes isotopicamente diferentes entre si são misturadas, a composição do produto gerado reflete a contribuição isotópica destas duas fontes, assim como a quantidade relativa de cada uma delas.¹⁵ Na prática, ao misturar polpa de caju (C_3) e açúcar de cana (C_4) para elaboração de um néctar, este terá valor isotópico intermediário entre as duas fontes, dependendo da proporção de cada uma delas.

A mensuração quantitativa da fonte C_3 e C_4 pode ser obtida pelas Equações 1 e 2:

$$\delta a * C_3 + \delta b * C_4 = \delta p \quad \text{Equação 1}$$

$$C_3 + C_4 = 1 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

- δa , δb e δp = enriquecimento isotópico relativo das fontes de carbono C_3 (caju), C_4 (açúcar de cana) e do produto, respectivamente (adimensional);
- C_3 e C_4 = proporção relativa da fonte C_3 (caju) e C_4 (açúcar) no produto, respectivamente (adimensional).

A maioria das técnicas isotópicas requer a utilização de banco de dados oriundo de valores isotópicos das matérias-primas (suco ou polpa de fruta e açúcar) como referência de comparação, para estimar a composição dos produtos a serem analisados. Porém, o banco de dados pode ser substituído pela análise isotópica de um padrão interno. A utilização de um componente interno como referência isotópica diminui erros de quantificação em função da variabilidade isotópica das matérias-primas.¹⁰ Para o néctar de caju, os sólidos insolúveis podem ser utilizados como padrão interno. O açúcar não apresenta constituinte como referência interna. Por isso, há a necessidade de adotar um valor isotópico fixo oriundo de um banco de dados de diversos tipos de açúcares.⁷

Baseado no exposto acima, os objetivos deste trabalho foram determinar a composição isotópica dos néctares comerciais de caju e, por meio de modelos de mistura, quantificar o teor de carbono oriundo de plantas com via fotossintética C_3 , no intuito de identificar as bebidas que não estão em conformidade com a legislação brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Todas as amostras foram obtidas no primeiro trimestre de 2010. Foram elas:

- Três polpas de caju fornecidas por diferentes indústrias produtoras de bebidas de caju;
- Vinte e oito açúcares de cana (cristal, refinado e líquido) doados por usinas sucroalcooleiras;
- Cinco tipos de aditivos comuns em todas as bebidas comerciais e permitidos pela legislação brasileira (ácido cítrico, ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e aroma natural de caju). Esses aditivos também foram obtidos junto às indústrias produtoras de bebidas de caju, bem como suas dosagens nas formulações;
- Quatro marcas de néctares comerciais de caju encontradas em supermercados da região de Botucatu/SP, as quais foram compradas em triplicata.

Após adquirir as matérias-primas junto às empresas, foram fabricados néctares de caju em laboratório. Utilizando polpa de caju a 10 °Brix (teor mínimo de sólidos solúveis determinado por lei),² açúcar de cana e água, foram produzidos, em duplicata, néctares conforme a legislação brasileira (com 15, 20 até 40% de polpa, m/m). Também foi fabricada bebida com quantidade de polpa abaixo do estabelecido pelo MAPA (ou seja, com 10% de polpa, m/m). Esses néctares foram fabricados com concentração final de sólidos solúveis em 10 °Brix (valor mínimo fixado para néctar de caju),³ utilizando o balanço de massa de sólidos solúveis (Equação 3). Em seguida, foi calculada a quantidade teórica de fonte C_3 (% C_3) nessas bebidas utilizando a Equação 4:

$$\frac{{}^{\circ}\text{Brix}_{\text{Polpa}} * M_{\text{Polpa}} + {}^{\circ}\text{Brix}_{\text{Açúcar}} * M_{\text{Açúcar}} + {}^{\circ}\text{Brix}_{\text{Água}} * M_{\text{Água}}}{M_{\text{Néctar}}} = {}^{\circ}\text{Brix}_{\text{Néctar}} * M_{\text{Néctar}} \quad \text{Equação 3}$$

$$\%C_3 = \frac{{}^{\circ}\text{Brix}_{\text{Polpa}} * M_{\text{Polpa}}}{{}^{\circ}\text{Brix}_{\text{Polpa}} * M_{\text{Polpa}} + {}^{\circ}\text{Brix}_{\text{Açúcar}} * M_{\text{Açúcar}}} * 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

- °Brix = teor de sólidos solúveis da polpa, do açúcar de cana (100 °Brix), da água (0 °Brix) e do néctar, respectivamente;
- M = massa da polpa, do açúcar, água e do néctar, respectivamente.

Preparo e Análise Isotópica das Amostras

Os néctares de caju fabricados em laboratório e as bebidas comerciais (δp) foram analisados isotopicamente, assim como suas frações açúcares purificados (δp) e sólidos insolúveis (padrão interno – δa), além dos açúcares de cana (δb) e dos aditivos. Todas as análises foram feitas em duplicata.

Para serem analisadas no Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS – Delta S Finnigan Mat), essas amostras foram preparadas da seguinte forma:

Néctares de caju fabricados em laboratório e bebidas comerciais – δp

Pipetou-se 0,35µL das amostras em cápsulas de estanho.

Açúcares purificados – δp

Para purificação dos açúcares extraídos dos néctares de caju, foi utilizado o método proposto por Koziet et al.¹² Neste método, 100mL de néctar foram centrifugados a 4500rpm (1610G) durante 5 minutos para a separação dos sólidos insolúveis. O líquido sobrenadante foi transferido para um bquer de 250mL, no qual se adicionou 4g de hidróxido de cálcio (P.A.). Em seguida, a mistura foi aquecida até 90°C, sob agitação, sendo novamente centrifugada, nas mesmas condições, para retirar os ácidos orgânicos. Novamente, o líquido sobrenadante foi coletado em um bquer de 250mL e adicionado de ácido sulfúrico a 2N até atingir pH=5, sendo novamente aquecido até 90°C. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a amostra foi mantida a 4°C por 12 horas, para remoção do excesso de cálcio. Neste período, ocorreu a formação de CaSO₄, o qual foi desprezado. Foi pipetado 0,35µL do sobrenadante (açúcar C₃ + açúcar C₄) em cápsulas de estanho.

Sólidos insolúveis (padrão interno) – δa

Uma alíquota de 50mL dos néctares de caju foi centrifugada a 4500rpm (1610G) durante 5 minutos para separação dos sólidos insolúveis.

Os sólidos insolúveis, depositados no fundo do tubo de centrífuga, receberam 20mL de água deionizada e foram agitados durante 1 minuto. Em seguida, o volume do tubo foi completado para 50mL com água deionizada e, novamente, centrifugado a 4500rpm (1610G) por 5 minutos. Repetiu-se este procedimento por mais quatro vezes (até °Brix=zero).

Os sólidos insolúveis, quando passam por um tratamento com acetona, eliminam carotenóides que interferem na mensuração do valor isotópico.¹⁷ Desse modo, após as cinco lavagens com água deionizada, adicionou-se 15mL de acetona pura aos sólidos insolúveis depositados no fundo do tubo, o qual foi agitado por 1 minuto. Em seguida, o mesmo foi completado para 50mL com água deionizada e centrifugado nas condições já mencionadas. Repetiu-se mais uma vez este procedimento e, em seguida, foram feitas mais duas lavagens com água deionizada para remover a acetona.

Os sólidos insolúveis foram transferidos para tubos *ependorffs* e liofilizados. Em seguida, foram pesados de 500 a 600µg da amostra em cápsulas de estanho.

Açúcares de cana (δb) e aditivos

As amostras sólidas de açúcares e aditivos foram moídas em moinho criogênico com nitrogênio líquido

(Spex CertiPrep 6750 Freezer/Mill) durante três minutos na temperatura de -196°C para obter um material homogêneo e com textura fina ($\leq 65\mu m$). As amostras líquidas foram diluídas com água deionizada até a concentração de 10 °Brix. As amostras sólidas (0,03mg) e as líquidas (0,35µL) foram colocadas em cápsulas de estanho.

Imediatamente após pesar ou pipetar as amostras em cápsulas de estanho, estas foram devidamente empacotadas e colocadas no amostrador do Analisador Elemental (EA 1108 - CHN - Fisons Elemental Analyzer) para serem queimadas a 1020°C, liberando CO₂. Este gás foi comparado com o CO₂ padrão (PDB) para mensurar os valores de $\delta^{13}C$ das amostras no IRMS.

A razão $^{13}C/^{12}C$ das amostras em relação ao padrão internacional *Pee Dee Belemnite* (PDB) foi calculada pela Equação 5:

$$\delta^{13}C(\text{Amostra,PDB}) = \left[\frac{(R_{\text{Amostra}} - R_{\text{Padrão}})}{R_{\text{Padrão}}} \right] * 10^3 \text{ Equação 5}$$

Onde:

- $\delta^{13}C$ =enriquecimento isotópico relativo da amostra em relação ao padrão PDB (adimensional);
- R=razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ da amostra e do padrão (adimensional).

O padrão internacional PDB trata-se de um fósil carbonatado sólido, da era Cretácea, denominado *Belemnitella americana*, da formação geológica *Pee Dee* do Estado norte-americano da Carolina do Sul,⁵ o qual apresenta razão $^{13}C/^{12}C$ de 0,00112372.¹⁸

Definição do Melhor Parâmetro de δp para Quantificação Prática de Fonte C₃ em Néctares de Caju Fabricados em Laboratório

Mensurando o $\delta^{13}C$ dos néctares de caju fabricados em laboratório (δp), dos seus açúcares purificados (δp), dos seus sólidos insolúveis (δa) e dos açúcares de cana (δb), calculou-se a quantidade prática de fonte C₃ nessas bebidas através das Equações 1 e 2. No entanto, foi possível adotar dois valores isotópicos diferentes em δp (néctar e seu respectivo açúcar purificado).

Os resultados práticos (IRMS) obtidos em cada um dos parâmetros de δp foram subtraídos da quantidade teórica de fonte C₃ (Equação 4 – item 2.1). Os *Erros* obtidos (|quantidade de fonte C₃ teórica – quantidade de fonte C₃ prática|) foram submetidos à análise de covariância ($\alpha=0,05$), utilizando o programa “SAS”, conforme a Equação 6:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta x_j + e_{ij} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

- y_{ij} =*Erro* observado da combinação i e nível j de x ;
- α_i =efeito do i -ésimo tratamento;
- β =parâmetro da regressão linear;
- x_j =nível da concentração j de polpa;
- e_{ij} =erro aleatório.¹⁹

Sendo o valor do teste F significativo ($p < 0,05$), os *Erros* de cada um dos parâmetros de δp foram comparados utilizando o Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).¹⁹ Além disso, foi mensurada a média e o desvio-padrão dos *Erros*.

Com base nas análises estatísticas e na média dos *Erros*, foi verificado qual parâmetro de δp teve os resultados práticos mais próximos dos resultados teóricos. O parâmetro escolhido foi utilizado para quantificar a concentração de carbono de fonte C_3 nas próximas etapas de desenvolvimento do método.

Comparação da Mensuração de Fonte C_3 entre Néctares de Caju Fabricados sem e com Aditivos

Para estimar a influência dos aditivos na quantificação de fonte C_3 foram fabricados cinco néctares de caju com aditivos e cinco sem aditivos. Esses néctares foram produzidos com 15% de polpa (m/m) a 10 °Brix^{2,3} e com concentração de sólidos solúveis de 10 °Brix.³ As quantidades de fonte C_3 foram calculadas de acordo com o item 2.3 e comparadas estatisticamente utilizando o Teste t para amostras pareadas ($\alpha = 0,05$).¹⁹

Os aditivos utilizados na produção dos néctares foram o ácido cítrico (0,3g/100mL), ácido ascórbico (0,05g/100mL), metabisulfito de sódio (0,004g/100mL), benzoato de sódio (0,05g/100mL) e aroma natural de caju (0,3g/100mL). Conforme mencionado anteriormente, essas quantidades foram informadas pelas indústrias produtoras de bebidas de caju.

Definição do Valor Isotópico para δb , Precisão do Método e Estimativa de Erro

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

Em δa foi utilizado o valor isotópico dos sólidos insolúveis extraídos dos néctares fabricados em laboratório. Em δb foram utilizados o valor isotópico mais leve, o médio e o mais pesado dos açúcares de cana (banco de dados). Para δp utilizou-se o valor isotópico do néctar fabricado em laboratório ou de seu respectivo açúcar purificado, conforme definido no item 2.3. Utilizando as Equações 1 e 2, o valor isotópico de δa (sólidos insolúveis) foi respectivamente combinado com o valor isotópico mais pesado, o valor médio e o mais leve de δb , juntamente com os valores isotópicos de δp , para mensurar as quantificações de fonte C_3 . Os valores dessas três quantificações foram subtraídos dos valores teóricos de fonte C_3 (Equação 4 – item 2.1) para estimar o *Erro* e comparados seguindo os tratamentos estatísticos do item 2.3. Além disso, foi calculado o erro total do método (média dos *Erros* + desvio-padrão) para cada combinação.

Definida a melhor combinação, o valor isotópico de δb foi utilizado para quantificar a porcentagem de fonte C_3 nos néctares comerciais. Nas porcentagens de fonte C_3 foi acrescido e subtraído o erro total do método.

Desenvolvimento do Limite de Legalidade para Néctares Comerciais de Caju

Para saber se as bebidas comerciais estavam em conformidade ou inconformidade com a legislação brasileira, foi necessário o desenvolvimento do limite de legalidade, o qual fornece a concentração mínima de fonte C_3 que um néctar comercial de caju deve apresentar para ser considerado legal, perante a lei.

O limite de legalidade foi obtido pela mensuração teórica da quantidade de fonte C_3 , calculada pela Equação 4, em néctares de caju com 10,0; 10,5; 11,0 até 13,0 °Brix e 15% de polpa (m/m) a 10 °Brix (menor valor permitido por lei).² Os valores obtidos foram relacionados com as respectivas concentrações de sólidos solúveis. A curva resultante originou o limite de legalidade.

Concentração de Fonte C_3 e Determinação da Legalidade dos Néctares Comerciais de Caju

Para calcular a concentração de fonte C_3 nos néctares comerciais de caju, o valor isotópico de δa (sólidos insolúveis extraídos das bebidas comerciais – padrão interno) foi agrupado com o valor isotópico de δb (açúcar de cana, definido no item 2.5), juntamente com o valor isotópico de δp (néctar comercial ou seu respectivo açúcar purificado, conforme o item 2.3), nas Equações 1 e 2. A estes resultados foi acrescido e subtraído o erro total do método (item 2.5), gerando uma faixa de quantificação máxima e mínima de fonte C_3 para cada bebida comercial.

Esses valores foram plotados em gráfico de dispersão e relacionados com °Brix das amostras. Neste mesmo gráfico, foram inseridos os valores do limite de legalidade. Quando a faixa de quantificação ficou acima ou se sobrepôs ao limite de legalidade, o néctar foi considerado legal. Caso toda a faixa tenha ficado abaixo deste limite, então foi considerado adulterado, conforme a legislação brasileira.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise Isotópica dos Açúcares de Cana e Aditivos

O valor isotópico dos açúcares cristal ($n=15$), refinado ($n=8$) e líquido invertido ($n=5$) foram, respectivamente, $-12,97 \pm 0,21\text{‰}$ ($-13,38/-12,67$), $-12,87 \pm 0,17\text{‰}$ ($-13,16/-12,62$) e $-13,21 \pm 0,13\text{‰}$ ($-13,36/-13,06$). O valor isotópico médio entre os três tipos de açúcares foi $-12,98 \pm 0,22\text{‰}$. Koziat et al.¹² analisando a composição isotópica de sucos de frutas e açúcares, encontraram o valor isotópico médio de $-11,23 \pm 0,20\text{‰}$ para açúcar de cana. O valor isotópico mais leve foi de $-11,51 \pm 0,01\text{‰}$ e o mais pesado de $-10,76 \pm 0,22\text{‰}$.¹¹ Os resultados obtidos por Koziat et al.¹² tiveram maior concentração de ^{13}C que os resultados apresentados no presente estudo. Segundo Boutton,¹ fatores ambientais (irradiação, umidade e salinidade do solo, etc.) e biológicos (capacidade fotossintética, variação genética, competição, etc.) podem influenciar na composição isotópica de carbono nas plantas C_3 e C_4 .¹

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

Os valores isotópicos do benzoato de sódio ($-29,46 \pm 0,19\%$), metabissulfato de sódio ($-23,56 \pm 0,17\%$) e aroma natural de caju ($-29,01 \pm 0,05\%$) foram característicos de plantas com metabolismo fotossintético C_3 . O ácido cítrico ($-12,99 \pm 0,12\%$) e o ácido ascórbico ($-12,07 \pm 0,07\%$) tiveram valores isotópicos semelhantes a plantas com metabolismo fotossintético C_4 . Os valores isotópicos do benzoato de sódio, ácido cítrico e ácido ascórbico corroboraram com os obtidos por Figueira.⁸

Análise Isotópica e Definição do Melhor Parâmetro de δp para Quantificação Prática de Fonte C_3 em Néctares de Caju Fabricados em Laboratório

Os valores isotópicos dos néctares fabricados em laboratório e de seus respectivos açúcares purificados tornaram-se mais leves à medida que se aumentou a adição de polpa de caju (Tabela 1). O valor isotópico dos sólidos insolúveis (padrão interno) não se alterou, permanecendo entre $-26,45$ a $-26,99\%$ independentemente da quantidade de polpa (Fonte C_3) ou açúcar de cana (Fonte C_4) adicionada. A utilização dos sólidos insolúveis como referência isotópica interna permite identificar o valor isotópico da matéria-prima de origem C_3 .

Para calcular a quantidade prática de fonte C_3 dos néctares fabricados em laboratório (Tabela 2), foi utilizado o enriquecimento isotópico relativo dos sólidos insolúveis em δa (Tabela 1), do açúcar de cana ($-13,03\%$) em δb e do néctar fabricado em laboratório ou de seu respectivo açúcar purificado em δp (Tabela 1).

Na análise de covariância, os valores do teste F não foram significativos para os diferentes parâmetros de δp ($p>0,05$). Como o uso do valor isotópico da bebida como

um todo (néctar) em δp teve a menor média dos *Erros*, este foi indicado para mensurar a quantidade de fonte C_3 em néctares de caju (Tabela 2). Figueira et al.⁹ verificaram a legalidade de suco de uva comercializado no mercado brasileiro por meio da análise isotópica. Nesse estudo, o melhor resultado para a quantificação de fonte C_3 foi obtido utilizando o valor isotópico do suco de uva em δp .⁹ Esta observação corrobora com o apresentado na Tabela 2.

Comparação da Mensuração de Fonte C_3 entre Néctares de Caju Fabricados sem e com Aditivos

A quantificação de fonte C_3 nos néctares fabricados sem aditivos ($15,68 \pm 0,14\%$) não diferiu estatisticamente das bebidas com aditivos ($16,05 \pm 0,40\%$). Esta observação também foi relatada por Nogueira que realizou o mesmo estudo comparativo com néctares convencionais e *light* de pêssego.¹³ Nas bebidas convencionais, a pequena quantidade de aditivos C_4 adicionada ao produto não foi suficiente para alterar a composição isotópica do néctar que já apresentava açúcar de cana (C_4) em sua composição. No entanto, as bebidas *light* apresentaram diferença quando fabricadas sem e com aditivos. Quando o néctar *light* foi produzido com aditivos, sua concentração de fonte C_3 foi menor. Como nesse tipo de bebida a concentração de fonte C_3 se aproxima de 100% , uma vez que o açúcar de cana é totalmente substituído por edulcorantes naturais ou artificiais, os aditivos C_4 foram mais representativos na composição isotópica do produto.

Definição do Valor Isotópico para δb , Precisão do Método e Estimativa de Erro

Para calcular as concentrações de fonte C_3 nos néctares fabricados em laboratório, em δa foi utilizado o valor isotópico dos sólidos insolúveis extraídos dos néctares (Tabela 1). Para δb (açúcar de cana), utilizaram-se os valores de $-13,38\%$ (valor isotópico mais leve), $-12,98\%$ (valor isotópico médio) e $-12,62\%$ (valor isotópico mais pesado). Em δp foram usados os valores isotópicos dos néctares fabricados em laboratório (Tabela 1).

Tabela 1 – Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 dos néctares fabricados em laboratório (δp) e das frações sólidos insolúveis (δa) e açúcar purificado (δp).

Nº	%Polpa ¹	δa (‰)		δp (‰)		δp (‰)	
		Sólidos Insolúveis	Desvio-padrão	Néctar	Desvio-padrão	Açúcar Purificado	Desvio-padrão
64	10	-26,99	0,01	-14,46	0,09	-14,49	0,05
65	15	-26,99	0,01	-15,24	0,04	-15,37	0,04
66	20	-26,96	0,01	-15,92	0,05	-16,04	0,06
67	25	-26,45	0,11	-16,59	0,12	-16,64	0,17
68	30	-26,85	0,04	-17,25	0,10	-17,41	0,05
69	35	-26,84	0,15	-18,06	0,10	-17,86	0,16
70	40	-26,65	0,02	-18,54	0,09	-18,60	0,06

¹% polpa a 10°Brix (m/m).

Na análise de covariância, os valores do teste *F* foram significativos ($p < 0,0001$). O teste de Tukey identificou diferença estatística da combinação 3 para as combinações 1 e 2. Porém, as combinações 1 e 2 não diferiram entre si. Como a combinação 2 teve a menor média dos *Erros*, o valor isotópico de -12,98‰ foi escolhido como valor padrão para δb (açúcar de cana). Este valor, juntamente com o erro total ($\pm 1,55\%$) (Tabela 3), foi utilizado para mensurar a quantidade de fonte C_3 nos néctares comerciais de caju.

Desenvolvimento do Limite de Legalidade para Néctares Comerciais de Caju

O limite de legalidade foi obtido pela mensuração teórica da quantidade mínima de fonte C_3 , calculada pela

Equação 4, em néctares de caju obtidos conforme o balanço de massa mostrado na Tabela 4:

Análise Isotópica e Determinação da Legalidade para Néctares Comerciais de Caju

Nos néctares comerciais de caju, a média dos valores isotópicos das frações sólidos insolúveis e açúcar purificado foram, respectivamente, $-27,29 \pm 0,24\%$ e $-15,38 \pm 0,10\%$ (Tabela 5). Não foram encontrados na literatura trabalhos isotópicos com bebidas de caju para comparar os resultados da Tabela 5.

Para calcular a quantidade de fonte C_3 nos néctares comerciais de caju foram utilizados os valores isotópicos dos néctares comerciais (δp) e da fração sólidos insolúveis

Tabela 2 – Comparação entre o valor teórico e prático de fonte C_3 nos diferentes parâmetros de δp em néctares de caju fabricados em laboratório.

Nº	%Polpa ¹	%C ₃ Teórico	1		2	
			$\delta_{SI} \times \delta_N$	Erro (%) ²	$\delta_{SI} \times \delta_{AP}$	Erro (%)
64	10	10	10,24	0,24	10,46	0,46
65	15	15	15,83	0,83	16,74	1,74
66	20	20	20,75	0,75	21,62	1,62
67	25	25	26,50	1,50	26,91	1,91
68	30	30	30,55	0,55	31,67	1,67
69	35	35	36,42	1,42	34,97	0,03
70	40	40	40,46	0,46	40,90	0,90
Média				0,82a ³		1,19a
Desvio-padrão				0,48		0,73

¹0% polpa a 10°Brix (m/m). ²[%fonte C_3 teórico – %fonte C_3 prático]. ³Teste de Tukey ($\alpha=0,05$); δ_{SI} vs. δ_N – valor isotópico dos sólidos insolúveis extraídos do néctar fabricado em laboratório (δa) vs. valor isotópico do néctar fabricado em laboratório (δp). δ_{SI} vs. δ_{AP} – valor isotópico dos sólidos insolúveis extraídos do néctar fabricado em laboratório (δa) vs. valor isotópico do açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório (δp).

Tabela 3 – Quantificação de fonte C_3 em néctares de caju fabricados em laboratório: escolha do melhor valor isotópico para δb e estimativa de erro.

Nº	%Polpa ¹	%C ₃ Teórico	1		2		3	
			-13,38‰ (δb)	Erro (%) ²	-12,98‰ (δb)	Erro (%)	-12,62‰ (δb)	Erro (%)
64	10	10	7,94	2,06	10,56	0,56	12,80	2,80
65	15	15	13,63	1,37	16,10	1,10	18,20	3,20
66	20	20	18,71	1,29	21,04	1,04	23,02	3,02
67	25	25	24,53	0,47	26,77	1,77	28,68	3,68
68	30	30	28,74	1,26	30,80	0,80	32,55	2,55
69	35	35	34,77	0,23	36,65	1,65	38,26	3,26
70	40	40	38,86	1,14	40,65	0,65	42,17	2,17
Média				1,12b ³		1,08b		2,95a
Desvio-padrão				0,61		0,47		0,50
Erro Total ($\pm$) ⁽⁴⁾				1,73		1,55		3,45

¹0% polpa a 10°Brix (m/m). ²[%fonte C_3 teórico – %fonte C_3 prático]. ³Teste de Tukey ($\alpha=0,05$). ⁽⁴⁾Erro Total = média dos erros + desvio-padrão.

(δa), conforme os resultados obtidos no item 3.2. Em δb (açúcar de cana) utilizou-se o valor isotópico de -12,98‰, conforme o item 3.4. Para cada quantificação de fonte C_3 foi inserido o erro total de $\pm 1,55\%$, calculado no item 3.4.

Relacionando as quantidades de fonte C_3 ao °Brix dos néctares comerciais de caju foi verificado que todas as amostras estavam acima do limite de legalidade e, portanto, em acordo com as normas do MAPA (Figura 1).

Trabalhos semelhantes realizados com néctares comerciais de maçã e de maracujá também mostraram resul-

tados positivos. Nesses estudos, as seis marcas de néctares de maçã e as quatro de maracujá analisadas estavam em conformidade com as normas da legislação vigente.^{6,8}

No entanto, para néctares de pêssego, os resultados não foram satisfatórios. Dentre as onze marcas analisadas, oito foram classificadas como adulteradas.¹⁴ Provavelmente, isso se deve ao fato da produção de polpa de pêssego ser mal explorada no país, sendo que hoje, praticamente 100% das polpas de pêssego utilizadas pelas indústrias de sucos

Tabela 4 – Balanço de massa para obtenção do limite de legalidade.

Nº	Polpa			Açúcar		Água		Néctar		Limite de Legalidade (%Fonte C_3)
	°Brix	%Adicionado	g	°Brix	g	°Brix	g	°Brix	g	
71	10	15	37,50	100	21,25	0	191,25	10,0	250	15,00
72	10	15	37,50	100	22,50	0	190,00	10,5	250	14,29
73	10	15	37,50	100	23,75	0	188,75	11,0	250	13,64
74	10	15	37,50	100	25,00	0	187,50	11,5	250	13,04
75	10	15	37,50	100	26,25	0	186,25	12,0	250	12,50
76	10	15	37,50	100	27,50	0	185,00	12,5	250	12,00
77	10	15	37,50	100	28,75	0	183,75	13,0	250	11,54

Tabela 5 – Enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}C$) em néctares de caju comerciais (δp) e da fração sólidos insolúveis (δa).

Nº	°Brix	δa (‰)		δp (‰)	
		Sólidos Insolúveis	Desvio-médio	Néctar	Desvio-médio
1	12,30	-27,62	0,03	-15,25	0,09
2	11,60	-27,18	0,18	-15,49	0,00
3	11,90	-27,07	0,03	-15,41	0,07
4	12,10	-27,30	0,04	-15,38	0,05
Média		-27,29		-15,38	
Desvio-padrão		0,24		0,10	

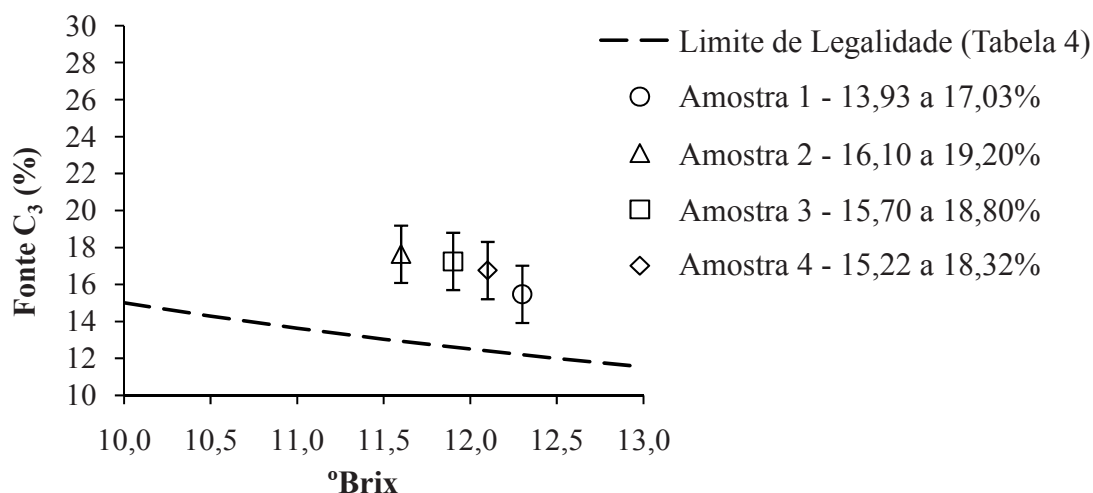


FIGURA 1 – Curva de legalidade para néctares comerciais de caju.

prontos são importadas do Chile e da Argentina, o que a torna uma matéria-prima dispendiosa.

Essas pesquisas mostram a importância de as autoridades responsáveis oficializarem e aplicarem o método isotópico para identificar os néctares de frutas fraudados comercializados no mercado brasileiro, o que se resultaria em melhoria da qualidade das bebidas oferecidas ao consumidor.

CONCLUSÃO

A metodologia de análise isotópica do Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), baseada nos metabolismos fotossintéticos de plantas C_3 (caju) e C_4 (açúcar de cana), mensurou com eficiência a composição isotópica dos néctares comerciais de caju, permitindo identificar a legalidade dessas bebidas. Todos os néctares comerciais de caju analisados respeitaram as determinações legais do MAPA.

FIGUEIRA, R.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G.; DUCATTI, C.; MISCHAN, M. M. Carbon isotope analysis in cashew nectars. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 561-569, out./dez. 2011.

■**ABSTRACT:** The objective of this work were to determine the isotopic composition of commercial cashew nectar and by mixture models, to quantify the carbon from plants holding the C_3 photosynthetic cycle so as to identify beverages that don't abide with the rules from the Brazilian legislation. The nectars were produced in a laboratory according to Brazilian law. Adulterated nectar was also produced with a quantity of cashew pulp below the allowed limit. In these beverages were calculated the theoretical percentages of C_3 source, by using the mass balance of soluble solids. For the isotope analysis the isotope values of cane sugar, cashew nectars and its fractions purified sugar and insoluble solids were measured. With these values were calculated the practical percentage of C_3 (real) source through the isotopic analysis in a mass spectrometer. The practical results were compared with the theoretical ones to define the best way to quantify the C_3 source. To identify the adulterated commercial nectars was measured to the legality limit according to the Brazilian legislation. Four trademarks of cashew nectars were analyzed and all of them classified legal. The legal limit enabled to identify the beverages in accordance with Brazilian law. The methodology was efficient for measuring the carbon from C_3 source in commercial cashew nectar.

■**KEYWORDS:** Beverages; adulteration; quality; carbon-13; IRMS; *Anacardium occidentale*.

REFERÊNCIAS

1. BOUTTON, T.W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S-I. **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. chap. 2, p. 47-82.
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução normativa n.1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa e suco de caju. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7777>. Acesso em: 05 out. 2010.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução normativa n.12, de 4 de setembro de 2003. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco tropical e néctar de caju. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 set. 2003. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>. Acesso em: 05 out. 2010.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009. Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da] República Federativa da União**, Brasília, DF, 5 jun. 2009. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20271>. Acesso em: 05 out. 2010.
5. CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochem. Cosmochim Acta**, v. 12, p. 133-149, 1957.
6. DINIZ, A. P. C. **Aplicação da razão isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) para detecção de adulteração em bebidas a base de maracujá - *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.** 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
7. 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**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1995. chap. 7, p. 125-138.
8. FIGUEIRA, R. **Análise isotópica da variabilidade natural do carbono-13 em suco, néctar e refrigerante de maçã (*Malus domestica*, L.)**. 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
9. FIGUEIRA, R. et al. Método de análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e quantificação da porcentagem de fonte C_3 em sucos de uva comerciais. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 100-106, 2010.

10. KELLY, S. D. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In: LEES, M. **Food authenticity and traceability**. London: Woodhead, 2003. chap. 7, p. 156-183.
11. KOZIET, J.; PICHLMAYR, F.; ROSSMANN, A. Carbon, oxygen and hydrogen isotopic intercomparison of fruit and vegetable juices. **Int. At. Energy Agency**, Vienna, p. 75-80, 1995.
12. KOZIET, J.; ROSSMANN, A.; MARTIN, G. J. Determination of the ^{13}C contents of sugars of fruit and vegetables juices: inter-comparison study. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 271, p. 31-38, 1993.
13. NOGUEIRA, A. M. P. **Análise isotópica da variabilidade natural do carbono-13 e avaliação energética em néctares de pêssego – *Prunus persica* (L.) Batsch**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
14. NOGUEIRA, A. M. P. et al. Análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) para detecção de adulteração em néctares de pêssego. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 115-124, 2011.
15. OLIVEIRA et al. Isótopos estáveis e produção de bebidas: de onde vem o carbono que consumimos? **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, p. 285-288, 2002.
16. ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Rev. Int.**, New York, v. 17, p. 347-381, 2001.
17. 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. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 340, p. 21-29, 1997.
18. 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. chap. 43, p. 944-956.
19. ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.

Recebido em: 26/10/2010

Aprovado em: 05/09/2011