

ANÁLISE ISOTÓPICA ($\delta^{13}\text{C}$) E LEGALIDADE EM NÉCTARES DE UVA

RICARDO FIGUEIRA*
ANDRESSA MILENE PARENTE NOGUEIRA**
CARLOS DUCATTI***
WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO****
MARTHA MARIA MISCHAN*****

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético C_3 em néctares de uva e identificar as bebidas comerciais em desacordo com as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os néctares foram produzidos em laboratório conforme a legislação brasileira. Também foram produzidas bebidas com quantidade de suco de uva abaixo do estabelecido pelo MAPA. Nas análises isotópicas foi mensurado o enriquecimento isotópico relativo dos néctares de uva e de sua fração açúcar purificado. Com esses resultados estimou-se a quantidade de fonte C_3 por meio da equação da diluição isotópica. Para determinar a existência de adulteração nos néctares comerciais foi necessário calcular o limite de legalidade de acordo com a legislação brasileira. Doze marcas de néctares foram analisadas e uma classificada como adulterada. A metodologia desenvolvida mostrou-se eficiente para quantificar o carbono de origem C_3 e identificar néctares comerciais de uva adulterados.

PALAVRAS-CHAVE: NÉCTAR DE UVA; ADULTERAÇÃO; BEBIDA DE FRUTA; *Vitis* ssp.; ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DE RAZÕES ISOTÓPICAS (IRMS).

* D.Sc. em Energia na Agricultura, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Botucatu, SP, Brasil (e-mail: ricardofigueira@hotmail.com).
** M.Sc. em Energia na Agricultura, UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, Laboratório de Bebidas, Botucatu, SP, Brasil (e-mail: andressa.nogueira@fca.unesp.br).
*** D.Sc. em Física Aplicada, UNESP, Instituto de Biociências, Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Botucatu, SP, Brasil (e-mail: ducatti@ibb.unesp.br).
**** D.Sc. em Energia na Agricultura, UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas, Laboratório de Bebidas, Botucatu, SP, Brasil (e-mail: venturini@fca.unesp.br).
***** D.Sc. em Estatística, UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Bioestatística, Botucatu, SP, Brasil (e-mail: mmischan@ibb.unesp.br)

1 INTRODUÇÃO

O combate à adulteração em bebidas constitui grande desafio para o mercado mundial. Como os produtos fraudulentos apresentam sofisticadas formulações de imitações, as metodologias de detecção de fraude se tornaram obsoletas. A adulteração em bebidas não alcoólicas à base de frutas representa um dos temas mais estudado na área da tecnologia de bebidas. Conforme a literatura especializada, o método isotópico é a única forma de mensurar a quantidade de suco adicionado na fabricação de bebidas à base de frutas (DONER, 1995).

A metodologia da razão isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) tornou-se extremamente útil quando a composição da bebida se baseia na mistura de compostos produzidos a partir de plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 (uva, maçã, laranja, pêssego, etc.) e C_4 (cana-de-açúcar, milho, sorgo e outros). Os vegetais de ciclo fotossintético C_3 apresentam valores de enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) entre -22,00 a -34,00‰. Nos vegetais de ciclo fotossintético C_4 , o enriquecimento isotópico relativo varia de -9,00 a -16,00‰ (KOZIET, ROSSMANN e MARTIN, 1993; ROSSMANN, 2001). Essa diferença no $\delta^{13}\text{C}$ entre plantas C_3 e C_4 também ocorre em seus produtos e derivados, podendo-se determinar com precisão qual a origem botânica do carbono em determinado produto (ROSSMANN, 2001).

A maioria das técnicas isotópicas requer a utilização de banco de dados oriundo de valores isotópicos das matérias-primas como referência de comparação para estimar a composição dos produtos a serem analisados (KELLY, 2003). Esses bancos de dados podem ser formados a partir da análise isotópica do produto ou pela análise do açúcar extraído do produto (KOZIET, PICHLMAYER e ROSSMANN, 1995). O valor isotópico do açúcar de cana também pode ser obtido pela compilação de banco de dados com diversos tipos de açúcares (DONER, 1995).

A técnica dos isótopos estáveis tem sido utilizada, rotineiramente, no controle de qualidade dos processos industriais de produção de bebidas e nas instituições oficiais de fiscalização como instrumento de autuação de produtos fraudados (KELLY, 2003). No Brasil, o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) que preconiza as características físicas, químicas e sensoriais das bebidas à base de fruta, é usado para o controle de sua qualidade por recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O MAPA define suco como a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem (BRASIL, 2009). De acordo com o PIQ, o suco de uva (*Vitis ssp.*) comercial não deve apresentar concentração de sólidos solúveis menor que 14°Brix (BRASIL, 2000).

Néctar é a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal ou de seu extrato, adicionado de açúcares, destinada ao consumo direto (BRASIL, 2009). A legislação brasileira não determina o PIQ para néctar de uva. No entanto, o MAPA estabelece que o néctar cuja quantidade mínima de polpa de determinada fruta não tenha sido fixada em Regulamento Técnico específico deve conter, no mínimo, 30% (m/m) da respectiva polpa, ressalvando a fruta com acidez ou conteúdo de polpa muito elevado ou sabor muito forte. Nesse caso, o conteúdo de polpa não deve ser inferior a 20% (m/m) (BRASIL, 2003).

Bebida com baixa caloria (*light*) é a bebida não alcoólica e hipocalórica, devendo apresentar o conteúdo de açúcares adicionados, normalmente, na bebida convencional inteiramente substituído por edulcorantes hipocalóricos e não calóricos, naturais ou artificiais. Os aditivos a serem utilizados nessa bebida devem ser os mesmos adicionados às bebidas convencionais (BRASIL, 2009).

A análise física e química convencional de bebidas à base de frutas, tendo como referência o PIQ definido pelo MAPA, não permite a quantificação do suco adicionado em sua formulação. Por esses métodos torna-se impossível quantificar o suco de uva presente no néctar comercial.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de análise isotópica para quantificar o carbono do ciclo fotossintético C_3 em néctares de uva comerciais e identificar as bebidas que estão em desacordo com a legislação brasileira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram cedidas por indústrias brasileiras de bebidas de uva, sendo quatro amostras de suco concentrado de uva, doze amostras de açúcar de cana (cristal, líquido invertido e refinado) e cinco tipos de aditivos (ácido cítrico, ácido ascórbico, aroma natural de uva, sacarose e acessulfame de potássio). Doze marcas de néctares comerciais foram adquiridas, em duplicata, no primeiro semestre de 2009, em supermercados de Botucatu, São Paulo.

O valor do enriquecimento isotópico relativo do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) foi obtido em Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (IRMS). Calculou-se a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em relação ao padrão internacional Pee Dee Belemnite (PDB) pela equação 1, sendo: $\delta^{13}\text{C}$ = enriquecimento isotópico relativo da amostra em relação ao padrão PDB (adimensional); R = razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e do padrão (adimensional):

$$\delta^{13}\text{C} (\text{Amostra, PDB}) = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}} / R_{\text{padrão}})] * 10^3 \quad (1)$$

Nos néctares de uva, a participação da fonte C_3 foi obtida pelas equações 2 e 3, cujo valor do enriquecimento isotópico relativo do produto reflete a proporção de carbono-13 de cada fonte. A simbologia das equações significa: δa e δb = enriquecimento isotópico relativo da fonte de carbono C_3 e C_4 , respectivamente (adimensional); C_3 e C_4 = proporção relativa da fonte C_3 e C_4 no produto, respectivamente (adimensional); $\delta \text{produto}$ = enriquecimento isotópico relativo do produto (adimensional):

$$\delta a * C_3 + \delta b * C_4 = \delta \text{produto} \quad (2)$$

$$C_3 + C_4 = 1 \quad (3)$$

2.1 PRODUÇÃO EM LABORATÓRIO DOS NÉCTARES DE UVA

Utilizando suco concentrado de uva, açúcar de cana e água foram produzidos, em duplicata, néctares de uva de acordo com a legislação brasileira. Também foram fabricadas bebidas com quantidade de suco abaixo do estabelecido pelo MAPA. Os néctares de uva foram produzidos com concentração de sólidos solúveis de 13°Brix (menor valor encontrado nos néctares comerciais). Esses produtos foram fabricados com 0, 5, 10 até 50 por cento de suco reconstituído a 14°Brix (BRASIL, 2000) em relação à massa total de néctar.

Calculou-se a quantidade teórica de fonte C_3 dos néctares mediante balanço de massa de sólidos solúveis desenvolvido pela Equação 4:

$$^{\circ}\text{Brix} = \frac{\text{Massa de sólidos solúveis}}{\text{Massa da solução}} * 100 \quad (4)$$

2.2 ANÁLISE ISOTÓPICA DOS SUCOS CONCENTRADOS, DOS NÉCTARES FABRICADOS EM LABORATÓRIO E DOS NÉCTARES COMERCIAIS DE UVA

Para a análise isotópica dos néctares de uva, 0,35 microlitro (μL), em duplicata, foi acondicionado em cápsula de estanho, empacotada e colocada em Analisador Elementar (EA 1108 - CHN - Fisons Elemental Analyzer) para ser queimada a 1020°C, liberando CO_2 . Esse gás foi comparado com o CO_2

padrão (PDB) para mensurar o enriquecimento isotópico relativo em Espectrômetro de Massas de Razões Isotópicas (IRMS) (Delta S Finnigan Mat) (DUCATTI, 2005).

2.3 ANÁLISE ISOTÓPICA DO AÇÚCAR PURIFICADO EXTRAÍDO DOS SUCOS CONCENTRADOS, DOS NÉCTARES FABRICADOS EM LABORATÓRIO E DOS NÉCTARES COMERCIAIS DE UVA

Para purificação do açúcar extraído dos produtos de uva utilizou-se o método proposto por Koziet, Pichlmayer e Rossmann (1995). A solução de açúcar purificado (açúcar C₃ + açúcar C₄) obtida no final do procedimento foi acondicionada em cápsula de estanho e colocada em Analisador Elementar.

2.4 ANÁLISE ISOTÓPICA DO AÇÚCAR DE CANA E DOS ADITIVOS UTILIZADOS EM NÉCTARES COMERCIAIS DE UVA

As amostras sólidas de açúcar e aditivos foram moídas em moinho criogênico com nitrogênio líquido (Spex CertiPrep 6750 Freezer/Mill) durante três minutos na temperatura de -196°C para se obter textura fina ($\leq 65 \mu\text{m}$) e homogênea. As amostras líquidas de açúcar e aditivos foram diluídas com água deionizada até a concentração de 10°Brix. As amostras sólidas (0,03 miligrama) e líquidas (0,35 microlitro) foram preparadas e colocadas em Analisador Elementar (DUCATTI, 2005).

2.5 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DE δa E δp NA ANÁLISE ISOTÓPICA DOS NÉCTARES DE UVA FABRICADOS EM LABORATÓRIO

Na produção dos néctares fabricados em laboratório utilizou-se suco concentrado de uva (C₃) e açúcar de cana (C₄). No suco concentrado, a análise isotópica foi efetuada no próprio suco (δa) e na sua fração açúcar purificado (δa). Obteve-se o valor isotópico do açúcar de cana (δb) a partir de banco de dados. Nos néctares fabricados em laboratório, a análise isotópica foi realizada na própria bebida (δp) e na sua fração açúcar purificado (δp). Como foram mensurados dois valores isotópicos para δa e δp , obtiveram-se quatro combinações para calcular a concentração de fonte C₃ de forma prática por meio das equações 2 e 3.

Para determinar qual a melhor combinação, os resultados práticos (IRMS) foram subtraídos da quantidade teórica de fonte C₃ (calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis - 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-se o programa “SAS”, conforme a equação 5, na qual: $y_{ij} = \text{Erro observado da combinação } i \text{ e nível } j \text{ de } x; \alpha_i = \text{efeito do } i\text{-ésimo tratamento}; \beta = \text{parâmetro da regressão linear}; x_j = \text{nível da concentração } j \text{ de suco e } e_{ij} = \text{erro aleatório (ZAR, 1999)}:$

$$y_{ij} = \bar{1} + \bar{\alpha}_i + \bar{\beta} x_j + e_{ij} \quad (5)$$

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

Com base nas análises estatísticas e na média dos Erros verificou-se qual combinação ofereceu os resultados práticos mais próximos dos resultados teóricos. A combinação escolhida foi utilizada para quantificar a concentração de carbono de fonte C₃ nas próximas etapas de desenvolvimento do método.

2.6 COMPARAÇÃO DA MENSURAÇÃO DE FONTE C₃ ENTRE NÉCTARES DE UVA FABRICADOS COM E SEM ADITIVOS

Para estimar a influência dos aditivos na quantificação de fonte C₃ foram produzidos cinco néctares de uva com aditivos e cinco sem aditivos. Essas bebidas foram elaboradas com concentração

de sólidos solúveis final em 13°Brix e adição de 30 por cento (m/m) de suco reconstituído a 14°Brix (BRASIL, 2000). Néctares *light* foram elaborados com concentração de sólidos solúveis final de 4,2°Brix, mantendo-se a adição de 30 por cento (m/m) de suco reconstituído a 14°Brix. Nessa bebida não houve adição de açúcar (BRASIL, 2009).

As quantidades de fonte C₃ foram calculadas de acordo com o item 2.5 e comparadas, estatisticamente, utilizando-se o Teste *t* para amostras pareadas ($\alpha=0,05$) (ZAR, 1999).

Os aditivos utilizados na produção dos néctares tradicionais foram: o ácido ascórbico (0,050 g/100 g), ácido cítrico (0,300 g/100 g) e aroma de uva (0,040 g/100 g). As quantidades citadas foram obtidas junto às indústrias produtoras de bebidas de uva. Para néctares *light*, além dos aditivos citados foram adicionados acessulfame de potássio (0,035 g/100 g) e sucralose (0,025 g/100 g), conforme estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2008).

2.7 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. Os valores isotópicos de δ_a e δ_b foram obtidos nos bancos de dados de suco concentrado e açúcar de cana, respectivamente.

Para estimar a precisão do método foram efetuadas três combinações com os valores de δ_a e δ_b . Em δ_a foram utilizados os valores isotópicos mais leve, médio e o mais pesado dos sucos concentrados ou de sua fração açúcar purificado, conforme citado no item 2.5. Em δ_b foram empregados os valores isotópicos mais leve, médio e o mais pesado dos açúcares de cana. Para δ_p utilizou-se o valor isotópico do néctar fabricado em laboratório ou de sua fração açúcar purificado, conforme citado no item 2.5. Utilizando as equações 2 e 3, os valores isotópicos mais pesados, os médios e os mais leves de δ_a foram respectivamente agrupados com os valores isotópicos mais pesados, os médios e os mais leves de δ_b , juntamente com o valor isotópico de δ_p para mensurar as quantificações de fonte C₃. Os valores dessas três quantificações foram subtraídos dos valores teóricos de fonte C₃ (item 2.1) para estimar o *Erro* e comparados conforme os tratamentos estatísticos do item 2.5. Além disso, calculou-se o erro total do método (média dos *Erros* + desvio-padrão) para cada combinação.

Definida a melhor combinação, os valores isotópicos de δ_a e δ_b foram utilizados para quantificar a porcentagem de fonte C₃ nos néctares comerciais. Nesses valores foi acrescido e subtraído o erro total do método (FIGUEIRA *et al.*, 2010).

2.8 LIMITE DE LEGALIDADE PARA NÉCTARES DE UVA COMERCIAIS

Para verificar se os néctares comerciais estavam ou não adulterados foi necessário estabelecer o limite de legalidade a fim de identificar as bebidas em conformidade ou inconformidade com as normas brasileiras. O limite de legalidade fornece a concentração mínima de fonte C₃ que o néctar de uva comercial deve apresentar para ser considerado de acordo com a legislação brasileira (FIGUEIRA *et al.*, 2010).

Obteve-se o limite de legalidade para néctar de uva pela mensuração teórica da quantidade de fonte C₃ mínima, calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis (°Brix) em néctares com concentrações de sólidos solúveis em 12, 13, 14, 15 e 16°Brix, adicionados com 30 por cento de suco de uva a 14°Brix em relação à massa do néctar. Os valores de quantidade mínima de fonte C₃ foram calculados utilizando-se a equação 4 e relacionados com as respectivas concentrações de sólidos solúveis (12; 13; 14; 15 e 16°Brix). A curva resultante originou o limite de legalidade.

2.9 CONCENTRAÇÃO DE FONTE C₃ E DETERMINAÇÃO DA LEGALIDADE EM NÉCTARES DE UVA COMERCIAIS

Para calcular a concentração de fonte C₃ nos néctares de uva comerciais foram utilizados os valores isotópicos de δ_a e δ_b definidos conforme o item 2.7. Para δ_p empregou-se o valor isotópico do

néctar comercial ou de sua fração açúcar purificado, conforme o item 2.5. Para cada concentração de fonte C₃ inseriu-se o erro total do método (item 2.7). Esses valores foram plotados em gráfico de dispersão e relacionados com seus respectivos °Brix. Nesse mesmo gráfico foram inseridos os valores do limite de legalidade. Quando a concentração de fonte C₃ ficou acima ou se sobreponha a esse limite, o néctar foi considerado legal. Quando a concentração ficou abaixo do limite, o néctar foi considerado adulterado (FIGUEIRA *et al.*, 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE ISOTÓPICA DAS MATERIAS-PRIMAS

Segundo Rossmann (2001), o enriquecimento isotópico relativo existente nos vegetais de ciclos fotossintéticos C₃ e C₄ também é observado nos seus produtos e subprodutos. Di Marco *et al.* (2006), estudando a variação do enriquecimento isotópico relativo de folhas e bagas de *Vitis vinifera* obtiveram valores de -24,00‰. O valor isotópico dos sucos concentrados analisados no presente trabalho foi mais leve que os citados na literatura (Tabela 1). Segundo Boutton (1996), fatores ambientais (irradiação, umidade do solo, salinidade do solo, etc.) e biológicos (capacidade fotossintética, variação genética, competição, etc.) têm potencial para influenciar a composição isotópica de carbono nas plantas C₃ e C₄. Comparando o enriquecimento isotópico relativo dos sucos concentrados e da sua fração açúcar purificado não foi observada diferença estatística entre eles (Teste *t*, $\alpha = 0,05$) (Tabela 1). Tal relação também foi constatada por Parker (1982) em estudo com sucos concentrados. No trabalho de Parker, os valores do enriquecimento isotópico relativo de carbono do suco e do açúcar purificado foram correlacionados apresentando pequena variação.

TABELA 1 - ENRIQUECIMENTO ISOTÓPICO RELATIVO ($\delta^{13}\text{C}$) DOS SUCOS CONCENTRADOS DE UVA - BANCO DE DADOS PARA δa

Nº	Suco (δ‰)	Desvio médio	Açúcar Purificado (δ‰)	Desvio médio
1	-27,35	0,01	-27,67	0,01
3	-27,64	0,01	-27,66	0,01
5	-27,26	0,09	-27,23	0,04
6	-27,14	0,02	-27,27	0,00
Média	-27,35a¹		-27,46^a	
Desvio-padrão	0,21		0,24	

¹Teste *t* ($\alpha = 0,05$).

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

TABELA 2 - ENRIQUECIMENTO ISOTÓPICO RELATIVO ($\delta^{13}\text{C}$) DOS AÇÚCARES DE CANA - BANCO DE DADOS PARA δ

Nº	Açúcar	Média ($\delta\text{‰}$)	Desvio-médio
7	Cristal	-13,38	0,12
8	Cristal	-13,20	0,09
9	Cristal	-13,18	0,04
10	Cristal	-13,06	0,13
11	Cristal	-12,83	0,00
12	Cristal	-12,92	0,02
Média		-13,09a ¹	
Desvio-padrão		0,20	
13	Líquido Invertido	-13,30	0,11
14	Líquido Invertido	-13,36	0,07
15	Líquido Invertido	-13,21	0,04
Média		-13,29a	
Desvio-padrão		0,08	
16	Refinado	-13,03	0,08
17	Refinado	-13,16	0,04
18	Refinado	-12,77	0,11
Média		-12,99a	
Desvio-padrão		0,20	
Média Geral		-13,11	
Desvio-padrão		0,20	

¹Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

3.2 ANÁLISE ISOTÓPICA DOS NÉCTARES DE UVA FABRICADOS EM LABORATÓRIO

O valor isotópico do néctar fabricado em laboratório e de sua fração açúcar purificado tornou-se mais leve conforme o aumento da participação da fonte de carbono de origem C_3 (suco de uva) na bebida (Tabela 3).

TABELA 3 - ENRIQUECIMENTO ISOTÓPICO RELATIVO DO CARBONO-13 DOS NÉCTARES FABRICADOS EM LABORATÓRIO E NA SUA FRAÇÃO AÇÚCAR PURIFICADO

Nº	% Suco ¹	Néctar de Laboratório ($\delta\text{‰}$)	Desvio-médio	Açúcar Purificado ($\delta\text{‰}$)	Desvio-médio
60	0	-13,50	0,07	-13,53	0,01
61	5	-14,14	0,01	-14,12	0,06
62	10	-14,96	0,05	-14,81	0,04
63	15	-15,70	0,02	-15,24	0,03
64	20	-16,43	0,10	-16,08	0,03
65	25	-17,23	0,06	-16,81	0,04
66	30	-18,40	0,04	-17,55	0,15
67	35	-18,64	0,08	-17,84	0,02
68	40	-19,52	0,04	-18,37	0,03
69	45	-20,25	0,08	-19,16	0,07
70	50	-21,12	0,15	-19,62	0,00

¹% suco reconstituído a 14°Brix fabricado com suco concentrado de uva (amostra 1).

3.3 DEFINIÇÃO DE δ_a E δ_p PARA QUANTIFICAR A PARTICIPAÇÃO DE FONTE C₃ EM NÉCTARES DE UVA FABRICADOS EM LABORATÓRIO

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado de uva ou de sua fração açúcar purificado (Amostra 1 – Tabela 1) em δ_a , do açúcar de cana (amostra 17 – Tabela 2) em δ_b , do néctar fabricado em laboratório ou de sua fração açúcar purificado (Tabela 3) em δ_p obtiveram-se as quantificações práticas da porcentagem de fonte C₃ (Tabela 4).

Na análise de covariância, os valores do teste *F* foram significativos ($p<0,0006$). O teste de Tukey mostrou diferença estatística entre as combinações 3 e 4. A combinação 3 não diferiu estatisticamente das combinações 1 e 2. Como a combinação 3 teve a menor variação dos *Erros*, essa foi indicada para mensurar a quantidade de fonte C₃ em néctares de uva (Tabela 4).

TABELA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE O VALOR TEÓRICO E O VALOR PRÁTICO DE FONTE C₃ NAS COMBINAÇÕES REALIZADAS DE δ_a E δ_p EM NÉCTARES DE UVA FABRICADOS EM LABORATÓRIO

Nº	% Suco ¹	% C3 Teórico	1		2		3		4	
			S x NL	Erro (%) ²	S x ANL	Erro (%)	AS x NL	Erro (%)	AS x ANL	Erro (%)
60	0	0,00	2,36	2,36	2,61	2,61	2,31	2,31	2,55	2,55
61	5	5,38	6,91	1,52	6,77	1,38	6,76	1,37	6,62	1,23
62	10	10,77	12,65	1,88	11,59	0,82	12,38	1,61	11,34	0,57
63	15	16,15	17,90	1,75	14,66	1,50	17,51	1,36	14,34	1,81
64	20	21,54	23,01	1,47	20,54	1,00	22,51	0,97	20,10	1,44
65	25	26,92	28,68	1,76	25,69	1,24	28,06	1,14	25,13	1,79
66	30	32,31	36,89	4,58	30,90	1,41	36,09	3,78	30,23	2,08
67	35	37,69	38,58	0,89	32,95	4,75	37,75	0,05	32,23	5,46
68	40	43,08	44,79	1,71	36,68	6,40	43,81	0,74	35,88	7,19
69	45	48,46	49,93	1,47	42,28	6,18	48,85	0,38	41,37	7,10
70	50	53,85	56,10	2,25	45,53	8,32	54,88	1,03	44,54	9,31
Média			1,97ab ³		3,24ab		1,34b		3,69a	
Desvio-padrão			0,95		2,68		1,01		3,01	

¹% suco reconstituído a 14°Brix fabricado com suco concentrado de uva (amostra 1); ²|porcentagem de fonte C₃ teórico – porcentagem de fonte C₃ prático; ³Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$); S vs. NL = suco concentrado (δ_a) vs. néctar fabricado em laboratório (δ_p); S vs. ANL = suco concentrado (δ_a) vs. açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório (δ_p); AS vs. NL = açúcar purificado extraído do suco concentrado (δ_a) vs. néctar fabricado em laboratório (δ_p); AS vs. ANL = açúcar purificado extraído do suco concentrado (δ_a) vs. açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório (δ_p).

3.4 COMPARAÇÃO DA MENSURAÇÃO DE FONTE C₃ ENTRE NÉCTARES DE UVA FABRICADOS COM E SEM ADITIVOS

A quantificação de fonte C₃ nos néctares fabricados com e sem aditivos foi realizada conforme o item 3.3. Nos néctares tradicionais, a quantificação de fonte C₃ na bebida sem aditivos ($34,51 \pm 0,53$) não diferiu estatisticamente da bebida com aditivos ($33,69 \pm 1,22$). Essa observação foi relatada por Figueira (2008) e Nogueira (2008), os quais realizaram o mesmo estudo comparativo com néctares de maçã e pêssego, respectivamente.

Nos néctares *light* houve diferença estatística entre as bebidas fabricadas sem (100,69 \pm 1,47) e com aditivos (93,62 \pm 1,36). Nogueira (2008), comparando néctares *light* de pêssego fabricados sem e com aditivos, também constatou diferença estatística na quantificação de fonte C₃. A diferença observada na bebida *light* pode estar relacionada ao teor de sólidos solúveis da bebida. Nos néctares *light*, o açúcar é totalmente substituído por edulcorantes naturais ou artificiais (BRASIL, 2009). Isso limita o teor de sólidos solúveis das bebidas *light* em torno de 4°Brix. Dessa forma, a quantidade de aditivos adicionados na bebida torna-se representativa em relação ao baixo teor de sólidos solúveis. Nos néctares tradicionais, o teor de sólidos solúveis varia em torno de 13°Brix e, por isso, a quantidade de aditivos adicionados não é significativa.

3.5 PRECISÃO DO MÉTODO E ESTIMATIVA DE ERRO

Para calcular as concentrações de fonte C₃ nos néctares fabricados em laboratório, em açúcar purificado extraído do suco concentrado - Tabela 1), foram utilizados os valores isotópicos de -27,67‰ (amostra 1), -27,46‰ (valor médio) e -27,23‰ (amostra 5). Para δb (açúcar de cana – Tabela 2) utilizaram-se os valores de -13,38‰ (amostra 7), -13,11‰ (valor médio) e -12,77‰ (amostra 18). Em δp foram usados os valores isotópicos dos néctares fabricados em laboratório (Tabela 3).

Na análise de covariância, os valores do teste *F* foram significativos (*p*<0,0001). O teste de Tukey mostrou diferença estatística entre todas as combinações. Como os padrões de δa (-27,67‰) e δb (-13,38‰) da combinação 1 proporcionaram a menor variação dos Erros, esses padrões juntamente com o erro total (1,35%) foram utilizados para mensurar a quantidade de fonte C₃ nos néctares de uva comerciais (Tabela 5).

**TABELA 5 - ESCOLHA DOS MELHORES VALORES ISOTÓPICOS
PARA δa E δb PARA QUANTIFICAR A PARTICIPAÇÃO DE
FONTE C₃ NOS NÉCTARES DE UVA COMERCIAIS**

Nº	% Suco ¹	% C3 Teórico	1		2		3	
			-27,67‰(δa) -13,38‰(δb)	Erro (%) ²	-27,46‰(δa) -13,11‰(δb)	Erro (%)	-27,23‰(δa) -12,77‰(δb)	Erro (%)
60	0	0,00	0,80	0,80	2,68	2,68	5,01	5,01
61	5	5,38	5,32	0,07	7,18	1,79	9,47	4,09
62	10	10,77	11,02	0,25	12,86	2,09	15,11	4,34
63	15	16,15	16,24	0,08	18,05	1,89	20,26	4,11
64	20	21,54	21,31	0,23	23,10	1,56	25,28	3,74
65	25	26,92	26,94	0,02	28,71	1,79	30,84	3,92
66	30	32,31	35,09	2,79	36,83	4,52	38,90	6,59
67	35	37,69	36,77	0,92	38,50	0,81	40,56	2,87
68	40	43,08	42,93	0,14	44,63	1,56	46,65	3,57
69	45	48,46	48,04	0,42	49,72	1,26	51,69	3,23
70	50	53,85	54,16	0,32	55,82	1,97	57,75	3,90
Média			0,55a ³			1,99b		4,12c
Desvio-padrão			0,80			0,96		0,99
Erro Total⁴			1,35			2,95		5,11

¹% suco reconstituído a 14°Brix fabricado com suco concentrado de uva (amostra 1); ²|porcentagem de fonte C₃ teórico – porcentagem de fonte C₃ prático|; ³Teste de Tukey ($\alpha=0,05$); ⁴Erro Total = média dos erros + desvio-padrão.

3.6 DESENVOLVIMENTO DO LIMITE DE LEGALIDADE PARA LEGALIDADE PARA NÉCTARES DE UVA COMERCIAIS

Para néctares tradicionais, o limite de legalidade foi obtido conforme o balanço de massa mostrado na Tabela 6.

TABELA 6 - BALANÇO DE MASSA PARA NÉCTARES DE UVA ADICIONADOS COM 30% DE SUCO DE UVA A 14°BRIX EM RELAÇÃO À MASSA DO NÉCTAR

Nº	%Suco 14°Brix	g Suco	°Brix Água	g Água	°Brix Açúcar	g Açúcar	Brix Néctar	g Néctar	Limite de Legalidade (%Fonte C ₃)
103	30	75	0	155,50	100	19,50	12	250	35,00
104	30	75	0	153,00	100	22,00	13	250	32,31
105	30	75	0	150,50	100	24,50	14	250	30,00
106	30	75	0	148,00	100	27,00	15	250	28,00
107	30	75	0	145,50	100	29,50	16	250	26,25

Alguns néctares comerciais apresentam em suas embalagens a denominação “*light*” e nesse caso, a bebida não poderá conter açúcar de cana (BRASIL, 2009). Portanto, a quantificação de fonte C₃ deverá ser 100% independente do °Brix da amostra. Porém, como verificado no item 3.4 houve diferença estatística entre a quantificação de fonte C₃ de néctares *light* fabricados com e sem aditivos. Por isso, o limite de legalidade foi definido com base na porcentagem de fonte C₃ mensurada para néctares *light* fabricados com aditivos, subtraído do desvio-padrão (93,62 - 1,36 = 92,26%).

3.7 ANÁLISE ISOTÓPICA E DETERMINAÇÃO DA LEGALIDADE DOS NÉCTARES DE UVA COMERCIAIS

O enriquecimento isotópico relativo dos néctares comerciais e de sua fração açúcar purificado está apresentado na Tabela 7. Não foram encontrados na literatura trabalhos semelhantes com néctares de uva.

Para calcular a quantidade de fonte C₃ nos néctares de uva comerciais foram utilizados em δa e δb os valores isotópicos de -27,67‰ e -13,38‰, respectivamente, conforme os resultados obtidos no item 3.5. Em δp empregaram-se os valores isotópicos do néctar comercial (Tabela 7), conforme definido no item 3.3. Para cada quantificação de fonte C₃ inseriu-se o erro total de $\pm 1,35\%$ (item 3.5). Relacionando as quantidades de fonte C₃ ao °Brix dos néctares tradicionais foi verificado que todas as amostras ultrapassaram o limite de legalidade, estando de acordo com as normas do MAPA (Figura 1). Nos néctares *light*, a concentração de fonte C₃ calculada para a amostra 35 ficou abaixo do limite de legalidade, evidenciando adulteração. As demais apresentaram concentração de fonte C₃ enquadrados padrões determinados pela legislação brasileira (Figura 2).

TABELA 7 - ENRIQUECIMENTO ISOTÓPICO RELATIVO DO CARBONO-13 EM NÉCTARES COMERCIAIS DE UVA E NA SUA FRAÇÃO AÇÚCAR PURIFICADO

Nº	Néctar	°Brix	Néctar (δ‰)	Desvio- médio	Açúcar Purificado (δ‰)	Desvio- médio
24	Tradicional	14,8	-19,79	0,07	-19,28	0,02
25	Tradicional	14,7	-18,77	0,09	-18,63	0,09
26	Tradicional	14,5	-21,11	0,04	-20,95	0,02
27	Tradicional	14,3	-20,85	0,01	-20,40	0,02
28	Tradicional	13,0	-19,34	0,08	-19,28	0,08
29	Tradicional	14,9	-18,71	0,10	-18,50	0,03
Média			-19,76		-19,51	
Desvio-padrão			1,03		0,98	
30	Light	6,7	-27,13	0,04	-27,67	0,01
31	Light	8,5	-27,15	0,06	-27,49	0,07
32	Light	5,3	-26,47	0,00	-27,23	0,01
33	Light	6,9	-27,02	0,00	-27,41	0,05
34	Light	4,8	-26,65	0,00	-27,01	0,03
35	Light	3,0	-26,36	0,04	-27,46	0,05
Média			-26,79		-27,38	
Desvio-padrão			0,35		0,23	

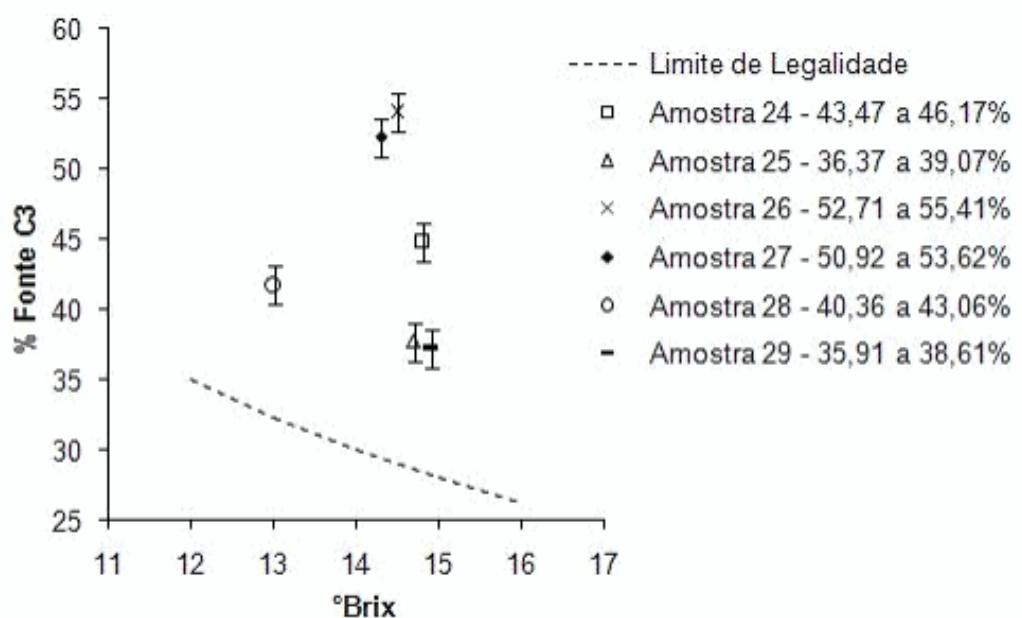


FIGURA 1 - RELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE FONTE C₃ E O °BRIX PARA CLASSIFICAR A LEGALIDADE DOS NÉCTARES DE UVA COMERCIAIS

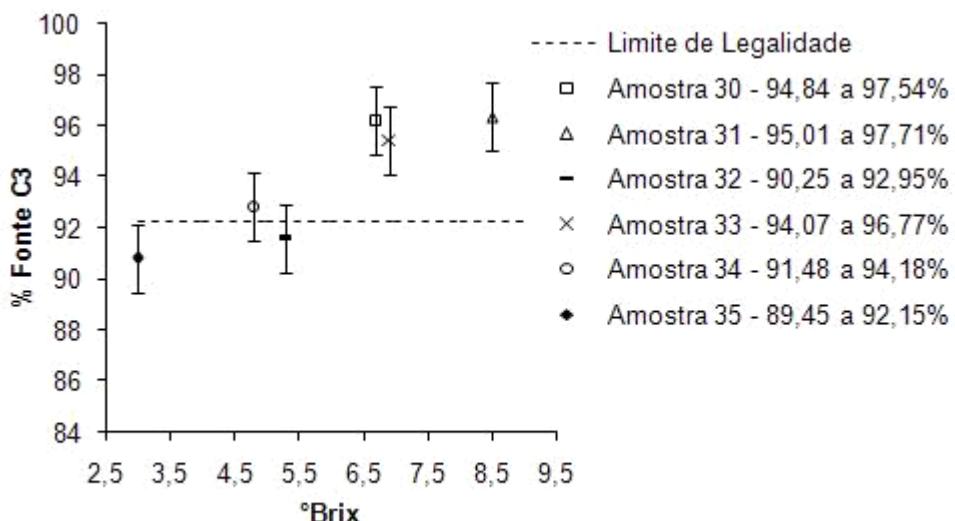


FIGURA 2 - RELAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE FONTE C₃ E O °BRIX PARA CLASSIFICAR A LEGALIDADE DOS NÉCTARES DE UVA COMERCIAIS *LIGHT*

4 CONCLUSÃO

A maioria dos néctares de uva analisados estava em concordância com as determinações legais brasileira. Nessas amostras, a adulteração ocorreu apenas ocasionalmente, não se constituindo em prática corrente.

A metodologia de análise isotópica do Carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) desenvolvida mostrou-se eficiente para mensurar a quantidade de fonte C₃ em néctares de uva comerciais, permitindo identificar com segurança as bebidas adulteradas.

ABSTRACT

ISOTOPIC ANALYSIS ($\delta^{13}\text{C}$) AND LEGALITY IN GRAPE NECTARS

The aim of this work was to develop an isotopic analysis method to quantify the carbon of C₃ photosynthesis cycle in grape nectar and to identify the commercial beverages in disagreement to the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) regulation. The nectars were produced in a laboratory, according to the Brazilian Law. Adulterated beverages with quantity of grape juice lower than the legal limit were also produced. Isotopic analysis measured the relative isotopic enrichment of grape nectar and its purified sugar fraction. Based on these results, it was possible to estimate the quantity of source C₃ by means of isotopic dilution equation. To determine the existence of adulteration in commercial nectars, it was necessary to create a legal limit according to the Brazilian Law. One of the twelve commercial brands of nectar analyzed was classified as adulterated. The developed methodology proved to be efficient to quantify the carbon of C₃ origin and identify the adulterated commercial grape nectar.

KEY-WORDS: GRAPE NECTAR; ADULTERATION; FRUIT BEVERAGE; *Vitis* ssp.; ISOTOPE RATIO MASS SPECTROMETER (IRMS).

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. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008. Dispõe sobre o regulamento técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 de março de 2008. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=30216&word=>. Acesso em: 21/10/2009.
- 3 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009. Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 5 de junho de 2009. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20271>. Acesso em: 27/10/ 2009.
- 4 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução Normativa n. 1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2000. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7777>. Acesso em: 27/10/2009.
- 5 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução Normativa n. 12, de 4 de setembro de 2003. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical e néctar. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 de setembro de 2003. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>. Acesso em: 27/10/2009.
- 6 DI MARCO, G.; GREGO, S.; TRICOLI, D.; TURI, B. Carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in fractions of field-grown grape. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 41, n. 2, p. 139-141, 2006.
- 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: M.Decker, 1995. chap.7, p.125-138.
- 8 DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2005. 205 p. (Apostila do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia).
- 9 FIGUEIRA, R. **Análise isotópica da variabilidade natural do carbono-13 em suco, néctar e refrigerante de maçã (*Malus Domestica*, Borkh)**. 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.
- 10 FIGUEIRA, R.; NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G.; DUCATTI, C.; MISCHAN, M. M. Método de análise isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) e quantificação da porcentagem de fonte C_3 em sucos de uva comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 147-155, 2010.
- 11 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.
- 12 KOZIET, J.; PICHLAYER, F.; ROSSMANN A. Carbon, oxygen and hydrogen isotopic intercomparison of fruit and vegetable juices. In: **REFERENCE and intercomparison materials for stable isotopes of light elements**. Vienna: International Atomic Energy Agency, 1995. p. 75-80. (IAEA-TECDOC-825).
- 13 KOZIET, J.; ROSSMANN, A.; MARTIN, G. J. Determination of the ^{13}C contents of sugars of fruit and vegetables juices: inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 271, p. 31-38, 1993.
- 14 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 Agronômicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2008.
- 15 PARKER, P. L. The chemical basis for the use of carbon-13/carbon-12 to detect the addition of sweeteners to fruit juice concentrates. **Flüssiges Obst**, Schönborn, v. 49, p. 692-694, 1982.
- 16 ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, New York, v.17, p.347-381, 2001.

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

AGRADECIMENTO

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