

DETERMINAÇÃO DA RAZÃO ISOTÓPICA $\delta^{13}\text{C}$ EM BEBIDAS COMERCIAIS A BASE DE LARANJA

Determination of isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$) in commercial orange beverages

Elvio Cardoso Queiroz¹, Carlos Ducatti², Waldemar Gastoni Venturini Filho³, Evandro Tadeu Silva⁴, Toshio Nojimoto⁵

RESUMO

Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de quantificar a proporção de carbono de fonte C_3 (suco de laranja) e carbono C_4 (açúcar de cana) em bebidas comerciais à base de laranja. Foram analisadas isotopicamente 33 diferentes marcas comerciais de bebidas de laranja. A composição isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) foi determinada por espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS). As equações empregadas para quantificar a proporção da fonte C_3 e C_4 de carbono nas bebidas apresentam fatores de correções baseados na concentração de açúcares redutores totais em relação aos sólidos solúveis. Os sólidos insolúveis (polpa) foram usados como padrão isotópico interno do suco de laranja empregado na formulação da bebida comercial, o que permitiu a quantificação de fonte C_3 nessas bebidas. As análises isotópicas das bebidas comerciais mostraram quatro adulterações, sendo uma amostra de suco de laranja integral, uma amostra de suco concentrado, duas amostras de suco adoçado de laranja. Para amostras com ausência de polpa na sua constituição, adotou-se como padrão de fonte C_3 o valor isotópico de $\delta^{13}\text{C}$ -26,19‰, proveniente da compilação de um banco de dados de 31 amostras de sucos puros de laranja provenientes de 12 regiões produtoras do Estado de São Paulo. Nas bebidas denominadas *repositores energéticos*, *bebida mista* e *“frutas cítricas”*, o valor isotópico de ^{13}C foi similar ao açúcar de cana ($\delta^{13}\text{C}$ -12,48‰), indicando pouco suco de fruta em sua formulação.

Termos para indexação: Suco, néctar, isótopos, adulteração, fraude.

ABSTRACT

This study aimed at quantifying the ratio of the carbon sources C_3 (orange juice) and C_4 (cane sugar) in orange-based commercial beverages. Orange beverages of 33 different trademarks were isotopically analyzed. Isotope ratio mass spectrometry (IRMS) was used to determine the carbon isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$). The equations used to quantify the source of carbon C_3 and C_4 presented correction factors based on the concentration of total reducing sugars in relation to soluble solids. The insoluble solids (pulp) were used as internal isotopic standard for the orange juice employed in commercial beverage. The isotope analysis of commercial beverages showed four adulterations: one sample of whole orange juice, one of concentrate juice, and two of sweetened orange juice. For samples with the absence of pulp, we adopted the isotopic value of $\delta^{13}\text{C}$ -26.19‰ as standard C_3 source, by compiling a database of 31 samples of pure orange juice from 12 producing regions of the state of São Paulo. In these beverages (energetic beverage, mixed beverage and “citric fruit”), the isotopic value of ^{13}C was similar to sugar cane ($\delta^{13}\text{C}$ -12.48‰) showing few fruit juice in its formulation.

Index terms: Juice, nectar, stable isotopes, adulteration, fraud.

(Recebido em 13 de junho de 2008 e aprovado em 21 de outubro de 2008)

INTRODUÇÃO

A legislação brasileira (Brasil, 1997b) define suco de laranja como sendo a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da laranja (*Citrus sinensis* Osbeck), em processo tecnológico adequado. O suco não poderá conter substâncias estranhas à fruta, sendo proibida a adição de aromas e corantes artificiais. Não é permitida a associação de açúcares e edulcorantes hipocalóricos e não calóricos na sua fabricação de suco. Essa mesma legislação classifica as bebidas de laranja da seguinte forma Tabela 1.

As plantas do ciclo fotossintético C_3 (laranjeira, videira, cevada, etc.), durante a fotossíntese, absorvem o CO_2 por meio dos estômatos da folha pelo processo de difusão, que é transferido até as células do mesófilo (cloroplasto). Nessas células, ocorre o processo de síntese orgânica, onde a reação química entre o CO_2 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).

¹ Agrônomo, Doutor, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, UNESP, Rua Engenheiro Prudente, 181 apto 134, 01550-000, São Paulo, SP – elvioqueiroz@gmail.com

² Agrônomo, Professor Doutor, Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, UNESP, Caixa postal 510, 18618-000, Botucatu, SP – ducatti@ibb.unesp.br

³ Agrônomo, Professor Doutor, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, UNESP, Av. José Barbosa de Barros 1780, 18610-307, Botucatu, SP – venturini@fca.unesp.br

⁴ Técnico Provisionado em Laboratório, Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, UNESP, Caixa Postal 510, 18618-000, Botucatu, SP – evandro@ibb.unesp.br

⁵ Agrônomo, Professor Titular, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, UNESP, Av. José Barbosa de Barros 1780, 18610-307, Botucatu, SP – toshio@fca.unesp.br

Tabela 1 – Classes de bebidas a base de laranja definido na legislação brasileira.

| Classificação | Quantidade máxima de adição de açúcar |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Suco de laranja integral | 0% |
| Suco de laranja | 10% ^A |
| Suco concentrado de laranja | 10% ^B |
| Suco reconstituído de laranja | 0% |
| Néctar de laranja | Não definido ^C |
| Refresco ou bebida de laranja | 70% |
| Bebida mista de laranja | Não definido ^C |
| Repositor energético de laranja | Não definido ^{C, D} |

^A calculado em base de gramas de açúcar por cem gramas de suco;

^B calculado em base de sólidos solúveis (°Brix) e deve ser mencionado no rótulo;

^C exige a adição de suco de laranja na sua composição;

^D bebida regulamentada por legislação específica (Brasil, 2005).

Os vegetais com ciclo fotossintético C_4 (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 CO_2 que entra nos estômatos por difusão passa para as células do mesófilo, onde é fixado na forma de HCO_3^- . Esse 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). Esses compostos são transportados para as células da bainha e, nessas células, são descarboxilados para formar o CO_2 e piruvato. O CO_2 concentrado por esse processo entra para o ciclo de síntese orgânica idêntico ao ciclo das plantas C_3 (Lehninger et al., 1995).

Ao longo do processo de produção de carboidratos, o carbono do CO_2 sofre um fracionamento isotópico, ocorrendo diminuição da concentração de ^{13}C e aumento da concentração de ^{12}C . 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 CO_2 por ação enzimática e, parâmetros físicos como a difusão e a relação da pressão interna e externa do CO_2 nos estômatos. Sendo assim, o valor do enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}C$) varia, entre -22 a -34 ‰ para as plantas C_3 e entre -9 a -16 ‰ nas plantas C_4 (Boutton, 1991; Koziat et al., 1993; Rossmann, 2001).

Essa diferença no enriquecimento relativo ($\delta^{13}C$) entre plantas C_3 e C_4 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).

A adulteração de suco de fruta é feita por meio da adição de açúcar de cana acima dos limites impostos pela legislação (Doner, 1995). O método da diluição isotópica é um importante procedimento para detectar esse tipo de fraude, especialmente no Brasil, principal produtor de suco de laranja concentrado e açúcar de cana do mundo. Ultimamente, tem sido utilizada rotineiramente no controle de qualidade dos processos industriais e nas instituições oficiais de fiscalização como instrumento de autuação de produtos fraudados (Kelly, 2003).

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 para detecção de fraudes (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 em razão da 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 mau manejo no apiário.

Guillou et al. (1998) e Giménez-Mirales et al. (1999) 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. Esses autores relatam ainda que, por meio 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. Dessa 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.

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 esses autores, os sólidos insolúveis (polpa) passam por um tratamento com acetona para eliminar os carotenóides, uma vez que estes podem interferir no valor isotópico da polpa em relação aos sólidos solúveis.

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, ao qual as amostras comerciais são confrontadas. Um banco de dados consome um grande tempo para formá-lo e é caro (Kelly, 2003).

A metodologia que utiliza a razão isotópica do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) é extremamente útil na quantificação de carbono de diferentes espécies botânicas, quando a composição do alimento ou bebida baseia-se na mistura de compostos produzidos a partir de plantas dos ciclos fotossintéticos C_3 (laranja, limão, tangerina, entre outros) e C_4 (açúcar de cana, milho, sorgo, entre outros) (Fritz & Fontes, 1986).

Neste trabalho, objetivou-se analisar com o auxílio da técnica isotópica de variação isotópica natural, bebidas de laranja comercializadas no Brasil e verificar se as mesmas estão em conformidade com os padrões de identidade e

qualidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1997a).

MATERIAIS E METODOS

Análise isotópica de ^{13}C

A análise do ^{13}C é realizada em espectrômetro de massa de razão isotópica, a mensuração do enriquecimento isotópico relativo entre a amostra (bebidas de laranja) e o padrão (rocha calcárea americana – *Pee Dee Belemnite*) foi feita utilizando-se da Equação 1.

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

$\delta_{(\text{amostra, padrão})}$ = enriquecimento isotópico relativo da amostra relativo ao padrão internacional (PDB), expresso em per mil (adimensional);

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

Nas amostras líquidas (previamente homogeneizadas, contendo açúcar purificado das bebidas), foi coletado com auxílio de micropipeta e $0,35\mu\text{L}$, em seguida, transferido para cápsulas de estanho contendo *Chromosorb W*, empacotadas e colocadas no Analisador Elementar (EA 1108 – CHN – *Fisons Elemental Analyzer*).

Nas amostras sólidas (contendo a polpa das bebidas) foi pesado $0,03\text{mg}$, em cápsulas de estanho, seguindo o mesmo procedimento das amostras líquidas.

A análise do carbono total foi realizada por combustão a seco (1.020°C) com auxílio de Analisador Elementar, liberando CO_2 , N_2 , NO_x , SO_2 , H_2O . No mesmo equipamento o CO_2 é separado dos demais e transportado (He) para o sistema de admissão do espectrômetro de massas de razão isotópica (Delta S Finnigan Mat), sendo comparado com o CO_2 padrão para a determinação do $\delta^{13}\text{C}$ (‰) da amostra.

As análises foram realizadas na Universidade Estadual Paulista no Laboratório de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências de Botucatu – São Paulo.

Preparo do açúcar purificado das bebidas comerciais de laranja

Na análise isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ dos açúcares contidos nas bebidas, seguiu-se a metodologia de extração e purificação proposta por Koziet et al. (1993).

Uma alíquota de 100mL de bebida foi centrifugada a 3.500rpm (1.250g), durante 10 minutos para a remoção dos sólidos insolúveis (polpa). Em seguida, foi adicionado ao sobrenadante 4g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ seguido de aquecimento até atingir a temperatura de 90°C .

A amostra foi novamente centrifugada (nas mesmas condições da primeira centrifugação), para retirar a borra contendo os ácidos. Ao sobrenadante foi adicionado solução de H_2SO_4 (1mol L^{-1}) até pH 5, em seguida o líquido foi aquecido até atingir a temperatura de 90°C , e posteriormente resfriado à 4°C por 12h, para remoção do excesso de cálcio na forma de gesso ($CaSO_4$). A solução resultante, contendo açúcar purificado, foi analisada isotopicamente ($\delta^{13}\text{C}$), conforme procedimento descrito em 2.1.

Preparo da polpa das bebidas comerciais de laranja

A polpa, retida na primeira centrifugação, recebeu 20mL de água destilada, sendo agitada para a ressuspensão dos sólidos insolúveis, durante 1 minuto, quando o volume do tubo de centrífuga foi completado para 50mL com água destilada e, subsequentemente, centrifugado a 3.500rpm (1.250g) durante 10 minutos. Repetiu-se esse procedimento por mais quatro vezes ($^\circ\text{Brix}$ do sobrenadante igual a zero).

À polpa, 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 esse procedimento e, em seguida, mais duas lavagens com água destilada.

As amostras das frações de polpa foram transferidas para tubos plásticos e liofilizadas.

Quantificação de carbono da fonte C_3 (suco de laranja) e C_4 (açúcar de cana) em bebidas que contém polpa

A quantificação do carbono das fontes C_3 e C_4 nas bebidas foi efetuada pela técnica de diluição isotópica. Esta técnica utiliza um único elemento químico, isótopos estáveis de carbono. A mensuração quantitativa foi obtida pelo balanço de massa isotópico, conforme Equação 2:

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

δa e δb = enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) das fontes de carbono da laranja e do açúcar de cana, relativo ao padrão internacional (PDB), respectivamente;

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

A e B = proporções relativas das fontes de carbono da laranja e açúcar de cana, para as quais

$$A + B = 1.$$

A Equação 2 pode ser desmembrada para o cálculo da contribuição relativa da fonte C_3 , considerando a polpa como o padrão interno de laranja. Foi inserido um fator de correção (X e Y), que representa a contribuição dos açúcares na constituição dos sólidos solúveis de cada fonte utilizada na formulação da bebida, Equação 3.

$$\% C_3 = \frac{Y(\delta_{\text{açúcar purificado}} - \delta_{\text{adulterante}})}{[X(\delta_{\text{polpa}} - \delta_{\text{açúcar purificado}})] + [Y(\delta_{\text{açúcar purificado}} - \delta_{\text{adulterante}})]} * 100 \quad (3)$$

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

δ_{polpa} = o enriquecimento isotópico relativo do padrão interno da bebida de laranja;

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

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

X = fator de correção: açúcar da fruta / $^\circ\text{Brix}$ da fruta;

Y = fator de correção: açúcar de cana / $^\circ\text{Brix}$ do açúcar de cana.

Quantificação de carbono de fonte C_3 (suco de laranja) e C_4 (açúcar de cana) em bebidas sem polpa

Para quantificar o carbono da fonte C_3 nas amostras comerciais de bebidas que não possuem polpa em sua constituição, fez-se uso de um banco de dados compilados pelos autores, de 31 amostras de suco de laranja de 8 variedades de laranja provenientes de 12 municípios do Estado de São Paulo. Para tanto, utilizou-se o valor de $-26,19\%$ (que representa a média dos valores isotópicos acrescentados de um desvio padrão).

Para quantificar o carbono C_3 tanto para as amostras que possuem polpa em sua constituição como para aquelas que não a possuem, há a necessidade de adotar um valor isotópico fixo para o adulterante (C_4). Para isso, fez-se uso de banco de dados de 15 amostras de açúcar de cana de 7 municípios do Estado de São Paulo; nesse caso, utilizou-se a média dos valores isotópicos, acrescida de um desvio padrão, com valor final de $-12,48\%$.

Determinação do fator de correção açúcar da fruta / $^\circ\text{Brix}$ da fruta

O teor de sólidos solúveis ($^\circ\text{Brix}$) de 31 sucos de diferentes variedades de laranja foi determinado em densímetro digital, enquanto que a concentração de açúcares redutores totais foi determinada por meio do método de Lane-Eynon, utilizando-se solução de Fehling, segundo a Association of Official Analytical Chemists-AOAC (1995). O fator de correção (X e Y) expressa a relação entre concentração de açúcares redutores totais e a massa de sólidos solúveis (ART / $^\circ\text{Brix}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização da Equação 3 requer a fixação dos fatores de correções açúcar / sólidos solúveis (°Brix). Essa relação foi determinada em 31 amostras de suco de laranja (Tabela 2).

O percentual de participação dos açúcares redutores totais na composição dos sólidos solúveis (°Brix) em suco de laranja é concordante com os dados publicados na literatura, Sendo observado um intervalo de 69,96 a 82,36%, enquanto a literatura relata um intervalo de 70 a 80% (Macrer et al., 1993).

Tabela 2 – Porcentagem de contribuição dos açúcares redutores totais na composição dos sólidos solúveis (°Brix) de suco integral fresco e reconstituído de laranjas oriundos de 12 municípios do Estado de São Paulo.

| Variedade | Cidade | Sólidos solúveis (°Brix) ¹ | Açúcares redutores totais (g / 100g) ² | X (%) ³ |
|------------------|-------------------------|---------------------------------------|---|--------------------|
| Laranja Lima | Santa Cruz do Rio Pardo | 10,51 | 8,66 | 82,36 |
| Laranja Valência | Aguai | 10,52 | 8,57 | 81,50 |
| Laranja Lima | Aguai | 9,45 | 7,69 | 81,38 |
| Laranja Hamlin | Assis | 12,13 | 9,67 | 79,72 |
| Laranja Pêra | Olímpia | 9,80 | 7,80 | 79,61 |
| Laranja Hamlin | Matão | 9,57 | 7,60 | 79,36 |
| Laranja Pêra | Matão | 9,65 | 7,64 | 79,22 |
| Laranja Pêra | Olímpia | 9,73 | 7,71 | 79,22 |
| Laranja Hamlin | Pompéia | 9,83 | 7,79 | 79,20 |
| Laranja Hamlin | Uchoa | 10,79 | 8,50 | 78,79 |
| Laranja Pêra | Aguai | 9,03 | 7,08 | 78,36 |
| Laranja Hamlin | Bebedouro | 9,80 | 7,67 | 78,24 |
| Laranja Lima | Santa Cruz do Rio Pardo | 9,65 | 7,51 | 77,85 |
| Laranja Hamlin | Santa Cruz do Rio Pardo | 10,58 | 8,23 | 77,76 |
| Laranja Pêra | Bebedouro | 10,00 | 7,68 | 76,76 |
| Laranja Pêra | Sertãozinho | 9,24 | 7,04 | 76,14 |
| Laranja Pêra | São Carlos | 11,62 | 8,83 | 75,98 |
| Laranja Westin | Matão | 8,75 | 6,63 | 75,76 |
| Laranja Pêra | Pompéia | 10,69 | 8,08 | 75,62 |
| Laranja Hamlin | Bebedouro | 9,22 | 6,97 | 75,56 |
| Laranja Pêra | Olímpia | 9,14 | 6,85 | 74,93 |
| Laranja Pêra | Santa Cruz do Rio Pardo | 10,31 | 7,71 | 74,73 |
| Laranja Barão | São Carlos | 10,59 | 7,90 | 74,55 |
| Laranja Westin | Santa Cruz do Rio Pardo | 9,12 | 6,80 | 74,55 |
| Laranja Valência | Uchoa | 9,09 | 6,70 | 73,74 |
| Laranja Lima | Aguai | 9,97 | 7,34 | 73,58 |
| Laranja Pêra | Uchoa | 10,53 | 7,73 | 73,45 |
| Laranja Pêra | Matão | 9,93 | 7,26 | 73,07 |
| Laranja Hamlin | Bebedouro | 9,55 | 6,87 | 71,96 |
| Laranja Valência | Catanduva | 9,53 | 6,78 | 71,19 |
| Laranja Natal | Aguai | 10,57 | 7,39 | 69,96 |

¹ (massa de sólidos solúveis / massa solução) x 100;

² ART;

³ (ART / °Brix) x 100.

Para o açúcar de cana, a relação $(ART / ^\circ\text{Brix}) \times 100$ é de 99,98% (Macrer et al., 1993). Sendo assim, para o suco de laranja, adotou-se o intervalo entre 0,7 a 0,8 (X) e para o açúcar de cana (adulterante), o valor 1,0 (Y).

Como o açúcar de cana utilizado para adoçar os produtos comerciais não possui um padrão interno, é impossível determinar seu valor isotópico, após o preparo da bebida. Em razão desta incerteza, o $\delta^{13}\text{C}$ (-13,57‰) não é o mais indicado, pois poderia prejudicar injustamente o fabricante honesto. Assim, adotou-se um valor isotópico mais pesado para o adulterante (-12,48‰) na Equação 3. Esse valor representa a média dos valores isotópicos dos açúcares do banco de dados Tabela 3, acrescida de um desvio padrão.

Para as bebidas que não possuem polpa em sua composição, só é possível quantificar a percentagem de carbono da fonte C_3 (Equação 3) com o uso de valores isotópicos de sucos de laranja fixo, valor este proveniente da compilação de um banco de dados (Tabela 4). Caso se adote o valor isotópico mais leve (-28,85‰), qualquer suco com valor isotópico mais pesado indicaria falsamente a adição de açúcar de cana, mesmo aquele sendo reconhecidamente puro.

Isso poderia prejudicar injustamente o fabricante honesto. Assim, visando a minimizar a incerteza para essas bebidas de laranja, adotou um valor isotópico mais pesado $\delta^{13}\text{C}$ -26,19‰, que representa a média dos valores isotópicos dos sucos, acrescida de um desvio padrão (Tabela 4).

Os resultados da quantificação de carbono C_3 (laranja) nas bebidas comerciais estão apresentados na Tabela 5. As amostras comerciais foram identificadas, segundo a classe de bebida mencionada nos respectivos rótulos, para preservar a identidade comercial do produto, segundo recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Os sucos 1, 2 e 3 são puros e estão em conformidade com a legislação brasileira, que não permite adição de açúcar em suco integral de laranja. Apesar das amostras 4, 5, 6, 7 e 8 apresentarem teores de 98,0-99,5% de carbono de fonte C_3 , não se pode caracterizá-las como adulteradas. O uso da Equação 3 apresenta um erro de quantificação da ordem de 2% (Queiroz, 2005). Esse erro é decorrente da variação isotópica natural dos compostos orgânicos da fruta, acrescido de erros experimentais de preparo de amostras, mais o erro analítico aceitável de espectrometria de massa.

Tabela 3 – Relação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de açúcar de cana de oriundos de 7 municípios produtores do Estado de São Paulo.

| Tipo de açúcar | Cidade | $\delta^{13}\text{C}$ (‰) |
|-----------------------|------------------|---------------------------|
| Líquido Invertido | Assis | -13,57 |
| Cristal | Lençóis Paulista | -13,18 |
| Cristal | Assis | -13,08 |
| Líquido | Lençóis Paulista | -12,93 |
| Cristal | Barra Bonita | -12,93 |
| Líquido | Assis | -12,88 |
| Cristal | Sertãozinho | -12,87 |
| Invertido | Sertãozinho | -12,79 |
| Líquido | Ribeirão Preto | -12,69 |
| Invertido | Lençóis Paulista | -12,69 |
| Líquido | Barra Bonita | -12,56 |
| Líquido | Sertãozinho | -12,54 |
| Xarope de Caramelo | Lençóis Paulista | -12,51 |
| Invertido | Lençóis Paulista | -12,51 |
| Invertido | Barra Bonita | -12,30 |
| Média | | -12,80 |
| Desvio Padrão | | 0,32 |
| Média + Desvio Padrão | | -12,48 |

Em relação ao porcentual de carbono de fonte C_3 dos sucos integrais de laranja, pode-se afirmar que a maioria desses sucos está em conformidade com seus rótulos, com exceção à amostra 9 que

possui adição de açúcar de cana (C_4) em sua composição, o que é proibido pela legislação brasileira para esta categoria de suco de laranja (Tabela 5).

Tabela 4 – Relação dos valores de $\delta^{13}C$ (‰) de suco de laranja de oriundos de 12 municípios produtores do Estado de São Paulo.

| Variedade | Cidade | $\delta^{13}C$ | |
|-----------------------|-------------------------|-------------------|--------|
| | | Açúcar Purificado | Polpa |
| Laranja Lima | Santa Cruz do Rio Pardo | -28,88 | -28,85 |
| Laranja Hamlin | Santa Cruz do Rio Pardo | -28,16 | -28,57 |
| Laranja Hamlin | Pompéia | -28,13 | -28,32 |
| Laranja Hamlin | Assis | -27,34 | -27,77 |
| Laranja Pêra | São Carlos | -27,68 | -27,65 |
| Laranja Barão | São Carlos | -27,67 | -27,61 |
| Laranja Lima | Aguai | -27,80 | -27,60 |
| Laranja Lima | Aguai | -27,54 | -27,47 |
| Laranja Westin | Santa Cruz do Rio Pardo | -27,41 | -27,33 |
| Laranja Valência | Uchoa | -26,96 | -27,32 |
| Laranja Pêra | Matão | -27,61 | -27,29 |
| Laranja Westin | Matão | -27,70 | -27,28 |
| Laranja Pêra | Santa Cruz do Rio Pardo | -27,49 | -27,06 |
| Laranja Hamlin | Matão | -27,10 | -27,05 |
| Laranja Lima | Santa Cruz do Rio Pardo | -27,42 | -27,01 |
| Laranja Hamlin | Bebedouro | -26,74 | -26,90 |
| Laranja Pêra | Bebedouro | -26,96 | -26,78 |
| Laranja Hamlin | Bebedouro | -27,00 | -26,76 |
| Laranja Hamlin | Uchoa | -26,84 | -26,75 |
| Laranja Hamlin | Bebedouro | -26,63 | -26,69 |
| Laranja Pêra | Olímpia | -26,27 | -26,61 |
| Laranja Pêra | Uchoa | -26,90 | -26,60 |
| Laranja Pêra | Matão | -26,68 | -26,56 |
| Laranja Pêra | Olímpia | -26,25 | -26,49 |
| Laranja Pêra | Sertãozinho | -26,40 | -26,29 |
| Laranja Pêra | Pompéia | -26,23 | -26,28 |
| Laranja Pêra | Olímpia | -26,56 | -26,25 |
| Laranja Valência | Catanduva | -26,24 | -26,23 |
| Laranja Natal | Aguai | -26,04 | -26,20 |
| Laranja Valência | Aguai | -25,62 | -25,96 |
| Laranja Pêra | Aguai | -25,02 | -25,01 |
| Média | | -27,01 | -26,99 |
| Desvio Padrão | | 0,81 | 0,79 |
| Média + Desvio Padrão | | -26,20 | -26,19 |

Tabela 5 – Quantificação de carbono de fonte C₃ em bebidas comerciais de laranja.

| Amostra | Rótulo do produto | $\delta^{13}\text{C}$ | | % C ₃ ^a | % C ₃ ^b |
|---------|----------------------------|-----------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Ac. Purificado | Polpa | | |
| 1 | Suco de laranja integral | -27,28 | -27,13 | 100,8 | 100,7 |
| 2 | Suco de laranja integral | -27,25 | -27,02 | 101,3 | 101,1 |
| 3 | Suco de laranja integral | -27,10 | -27,13 | 99,8 | 99,9 |
| 4 | Suco de laranja integral | -26,94 | -27,05 | 99,4 | 99,5 |
| 5 | Suco de laranja integral | -26,68 | -27,02 | 98,1 | 98,4 |
| 6 | Suco de laranja integral | -26,52 | -26,62 | 99,4 | 99,5 |
| 7 | Suco de laranja integral | -26,46 | -26,79 | 98,2 | 98,4 |
| 8 | Suco de laranja integral | -26,37 | -26,73 | 98,0 | 98,2 |
| 9 | Suco de laranja integral | -23,03 | -27,00 | 77,0 | 79,2 |
| 10 | Suco de laranja | -27,55 | -27,31 | 101,3 | 101,1 |
| 11 | Suco de laranja | -26,97 | -27,27 | 98,4 | 98,6 |
| 12 | Suco de laranja | -26,83 | -26,76 | 100,4 | 100,3 |
| 13 | Suco de laranja | -26,64 | -26,88 | 98,7 | 98,8 |
| 14 | Suco de laranja orgânico | -26,42 | -26,80 | 97,9 | 98,1 |
| 15 | Suco de laranja adoçado | -25,17 | -27,50 | 87,2 | 88,6 |
| 16 | Suco de laranja | -21,97 | -26,53 | 72,2 | 74,8 |
| 17 | Suco de laranja adoçado | -20,72 | -27,06 | 61,9 | 65,0 |
| 18 | Suco de laranja adoçado | -20,58 | -26,61 | 62,7 | 65,7 |
| 19 | Suco de laranja | -19,90 | -26,64 | 57,9 | 61,1 |
| 20 | Suco de laranja adoçado | -19,62 | -26,99 | 54,8 | 58,1 |
| 21 | Suco de laranja adoçado | -18,01 | -26,96 | 43,6 | 46,9 |
| 22 | Suco de laranja adoçado | -15,13 | -27,23 | 21,5 | 23,8 |
| 23 | Suco concentrado s/ açúcar | -26,40 | -26,38 | 100,1 | 100,1 |
| 24 | Suco concentrado | -26,21 | -26,56 | 98,0 | 98,3 |
| 25 | Suco concentrado c/ açúcar | -19,29 | -26,59 | 54,1 | 57,3 |
| 26 | Nectar de laranja | -19,92 | -27,47 | 55,4 | 58,7 |
| 27 | Néctar de laranja | -17,46 | -26,92 | 40,0 | 43,2 |
| 28 | Néctar de laranja | -17,27 | -26,45 | 39,8 | 43,0 |
| 29 | Refresco de laranja | -17,60 | -27,26 | 40,1 | 43,4 |
| 30 | “Frutas cítricas” | -13,11 | - ^c | 6,2 | 7,0 |
| 31 | Bebida Mista | -12,94 | - ^c | 4,7 | 5,3 |
| 32 | Repositor energético | -13,08 | - ^c | 5,9 | 6,7 |
| 33 | Repositor energético | -12,98 | - ^c | 5,0 | 5,7 |

^a Equação 3 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 3 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 Inexistência de polpa. Valores de % de C₃ calculados com a Equação 3, utilizando $\delta^{13}\text{C}$ -26,19‰, do banco de dados de δ_{polpa} .

Os sucos de laranja (amostras 10 a 20) apresentaram um percentual de 54,8 a 101,3% de carbono de fonte C_3 em suas composições, estando em conformidade com a legislação brasileira. Nesse caso, a lei prevê adição de até 10% de açúcar em relação à massa do produto. Exemplificando, 100g de um suco a 10,5°Brix pode receber 10g de açúcar a 100°Brix, resultando em 110g de bebida a 18,6°Brix. Isso significa que 51,2% da massa de sólidos solúveis são oriundos de fonte C_3 e o restante de fonte C_4 .

As amostras 21 e 22 de suco de laranja adoçado apresentaram valores de 43,6 a 46,9% e 21,5 a 23,8% de carbono de fonte C_3 em suas formulações, estando fora da legalidade.

As amostras 23 e 24 (sucos concentrados) não apresentaram adição de açúcar de cana, enquanto que a amostra 25 apresentou aproximadamente 54,1 a 57,3% de fonte C_4 (açúcar de cana) em sua composição, estando em desacordo com a legislação brasileira que admite o emprego de apenas 10% de açúcar na base do Brix. Deve-se destacar que para o suco concentrado, a adição de açúcar (10%) deve ser calculada em função dos sólidos solúveis e não da massa do suco.

Os néctares de laranja (amostras 26, 27 e 28) apresentaram de 39,8 a 58,7% de suco em suas composições. Como a legislação brasileira não define os padrões de identidade e qualidade para o néctar de laranja, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento recomenda consultar o Codex Alimentarius (2005). Esta norma internacional estabelece que o néctar de laranja deva conter pelo menos 50% de suco em sua composição. Assim, as amostras 27 e 28 podem ser consideradas adulteradas.

O refresco de laranja (amostra 29) está em conformidade com a legislação brasileira, uma vez que a lei exige que refrescos de frutas contenham, no mínimo, 30% de suco de fruta em sua composição.

Nas amostras 30 a 33, não foi possível extrair polpa, em razão da sua inexistência nessas bebidas, o que impossibilitou o uso do padrão interno para o valor isotópico do suco de laranja (Macrer et al., 1993). Para quantificar a adição de açúcar de cana naquelas bebidas, foi necessário adotar o valor isotópico de laranja -26,19%, Tabela 4.

Os repositores energéticos, “frutas cítricas” e bebida mista, apresentaram valores isotópicos muito próximos ao da cana de açúcar, indicando que a quantidade de suco de laranja utilizado na formulação da bebida é pequena. Porém, estes produtos são vendidos como bebidas de mesma característica de um suco de laranja, levando o consumidor ao engano. No caso específico da amostra 30, a legislação brasileira não define o que seja

“frutas cítricas”, inscrição que consta no rótulo desta bebida.

CONCLUSÃO

Do total das 33 amostras comerciais analisadas, uma de suco de laranja integral, duas de suco de laranja, duas de néctares e uma de suco concentrado de laranja, estão adulteradas.

Pode-se verificar também que as bebidas denominadas de “*frutas cítricas*”, *bebidas mistas* e *repositores energéticos*, na sua totalidade, possuem pequena quantidade de suco em suas formulações.

Para o período de coleta das amostras (2004/2005), pode-se concluir que o mercado brasileiro de bebidas à base de laranja apresentou problemas pontuais de adulteração.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP – processo nº 03/05467-2.

À Laranja Brasil, Usina Nova América, Cargill e Frigor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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, 1991. chap.11, p.173-185.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto nº 3510, de 16 de junho de 2000. Altera o Decreto 2314 de 4 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jun. 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1012>>. Acesso em: 10 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 2314, de 4 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 set. 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 10 out. 2007.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para misturas para o preparo de alimentos e alimentos prontos para o consumo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/php/home.php>>. Acesso em: 10 out. 2007.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Codex general standard for fruit juices and nectars**: CODEX STAN 247-2005. Disponível em: <www.codexalimentarius.net/download/stands/10154/CXS_247e.pdf>. Acesso em: 15 out. 2007.
- 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: M.Decker, 1995. chap.7, p.125-138.
- FRITZ, P.; FONTES, J.C. Isotope and food. In: MARCEL, G.H. **HandBook of environmental isotope geochemistry**. Tokyo: Elsevier, 1986. v.2, chap.12, p.507-548.
- 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 Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.47, p.2645-2652, 1999.
- GUILLOU, C.; KOZIET, J.; ROSSMANN, A.; MARTIN, G.J. Determination of the ^{13}C contents of organic acids and sugars in fruit juices: inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.388, p.137-143, 1999.
- GUILLOU, C.; LIPP, M.; RADOVIC, B.; RENIERO, F.; SCHMIDT, M.; ANKLAM, E. 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.
- KELLY, S.D. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In: LEES, M. **Food authenticity and traceability**. London: Woodhead, 2003. chap.7, p.156-183.
- KOZIET, J.; 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.
- KRUEGER, D.A. Applications of stable ratio analysis to problems of fruit juice adulteration. In: NAGY, S.; ATTAWAY, J.A.; RHODES, M.E. **Adulteration of fruit juice beverage**. 2.ed. New York: M.Decker, 1995. chap.7, p.109-124.
- 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, 1993. v.2, p.994-1023.
- QUEIROZ, E.C. **Utilização dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio na detecção de adulteração e avaliação energética de bebidas de laranja**. 2005. 73p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
- OSSI, N.F.; MARTINELLI, L.A.; LACERDA, T.H.M.; CAMARGO, P.B.; VICTÓRIA, R.L. Análise da adulteração de méis por açúcares comerciais utilizado-se a composição isotópica de carbono. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.2, p.199-204, 1999.
- ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, New York, v.17, p.347-381, 2001.
- ROSSMANN, A.; KOZIET, J.; MARTIN, G.J.; DENNIS, M.J. Determination of the carbon-13 content of sugars and pulp from fruit juices by isotope-ratio mass spectrometry (internal reference method) a European interlaboratory comparison. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.340, p.21-29, 1997.