

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITTA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE ISOTÓPICA DA VARIABILIDADE NATURAL DO
CARBONO-13 E ANÁLISE ENERGÉTICA EM SUCO, NÉCTAR E
REFRIGERANTE DE MAÇÃ (*Malus domestica*, Borkh)**

RICARDO FIGUEIRA

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

BOTUCATU – SP

Maio – 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITTA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE ISOTÓPICA DA VARIABILIDADE NATURAL DO
CARBONO-13 E ANÁLISE ENERGÉTICA EM SUCO, NÉCTAR E
REFRIGERANTE DE MAÇÃ (*Malus domestica*, Borkh)**

RICARDO FIGUEIRA

Orientador: Prof. Dr. Waldemar Gastoni Venturini Filho

Colaborador: Prof. Dr. Carlos Ducatti

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

BOTUCATU – SP

Maio – 2008

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

F475a Figueira, Ricardo, 1980-
Análise isotópica da variabilidade natural do carbono-13 e análise energética em suco, néctar e refrigerante de maçã (*Malus domestica*, Borkn) / Ricardo Figueira. - Botucatu : [s.n.], 2008.
xx, 141 f. : gráfs., tabs.

Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008
Orientador: Waldemar Gastoni Venturini Filho
Colaborador: Carlos Ducatti
Inclui bibliografia.

1. Maçã - Produtos. 2. Bebidas - Legislação. 3. Carbono - Isótopos. 4. Refrigerantes. 5. Suco de frutas. 6. Néctar de frutas. I. Venturini Filho, Waldemar Gastoni. II. Ducatti, Carlos. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

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

TÍTULO: "ANÁLISE ISOTÓPICA DA VARIABILIDADE NATURAL DO CARBONO-13
E ANÁLISE ENERGÉTICA EM SUCO, NÉCTAR E REFRIGERANTE DE
MAÇÃ (*Malus domestica*, Borkh.)"

ALUNO: RICARDO FIGUEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO


Aprovado pela Comissão Examinadora




PROF. DR. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO



PROF. DR. LÉA SILVIA MÁRIA SANT'ANA



PROF. DR. CARLOS DUCATTI



PROF. DR. MURIS SLEIMAN



PROF. DR. JOSÉ ALBERTINO BENDASSOLLI

Data da Realização: 16 de maio de 2008.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP – Campus de Botucatu, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Prof. Dr. Waldemar Gastoni Venturini Filho e ao Prof. Dr. Carlos Ducatti pela amizade, dedicação e envolvimento neste trabalho.

Prof. Dr. José Albertino Bendassolli, Dr. Muris Sleiman, Profa. Dra. Léa Silvia Sant'Ana, Prof. Dr. Carlos Ducatti e Prof. Dr. Waldemar G. Venturini Filho pelas pertinentes sugestões apresentadas na defesa desta tese.

A minha família pela pelo amor com que me criaram e educaram.

A minha mãe, Vera Lúcia Fanella, e minha irmã, Lisandra Figueira, que com muito sacrifício possibilitaram mais essa conquista.

A minha namorada Daniela Cravari pelo amor e compreensão pelos momentos de ausência.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bebidas e do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, Alaine, Ana Paola, Cecília, Cibele, Daniela, Edilena, Érica, Juliana, Muris, Priscila, Roberto e Silvia.

Ao Dr. Élvio Cardoso Queiroz pelas explicações sobre isótopos estáveis ambientais em bebidas de laranja.

À Andressa Nogueira pela ajuda e amizade de todos esses anos.

À Cristiane Pilon pelo auxílio nas análises energéticas.

Ao Evandro Tadeu da Silva pelo cuidado nas análises isotópicas.

Às empresas produtoras de bebidas de maçã pela colaboração no envio das matérias-primas bem como pelas informações concedidas.

À FAPESP pela bolsa de Doutorado Direto concedida (proc. n° 06/60898-7).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XIX
LISTA DE EQUAÇÕES.....	XX
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUÇÃO.....	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. Isótopos estáveis.....	6
4.2. Ciclos fotossintéticos.....	9
4.3. Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C ₃	10
4.4. Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C ₄	12
4.5. Diluição isotópica.....	13
4.6. Aplicações dos isótopos estáveis em alimentos e bebidas.....	15
4.7. Legislação brasileira sobre suco, néctar e refrigerante de maçã.....	16
4.7.1. Suco de maçã.....	16
4.7.2. Suco integral.....	17
4.7.3. Suco de fruta.....	17
4.7.4. Suco concentrado.....	17
4.7.5. Suco reconstituído.....	18
4.7.6. Refresco ou bebida de fruta.....	18
4.7.7. Néctar de maçã.....	18
4.7.8. Refrigerante de maçã.....	18
4.8. A maçã.....	19
4.9. Comércio da maçã e derivados.....	20

4.10. Valor energético de bebidas.....	20
4.10.1. Bomba calorimétrica.....	21
4.10.2. Composição centesimal.....	21
4.10.3. Tabela de composição de alimentos.....	21
5. MATERIAIS E MÉTODO.....	23
5.1. Materiais.....	23
5.1.1. Matérias-primas.....	23
5.2. Método.....	24
5.2.1. Obtenção de bebidas padrão e de bebidas adulteradas de maçã.....	24
5.2.1.1. Produção em laboratório do suco de maçã clarificado e polposo..	24
5.2.1.2. Produção em laboratório de néctar de maçã.....	24
5.2.1.3. Produção em laboratório de refrigerante de maçã.....	25
5.2.2. Análises físico-químicas das matérias-primas, dos sucos, néctares e refrigerantes produzidos em laboratório e dos produtos comerciais de maçã....	25
5.2.3. Análise isotópica das matérias-primas, das bebidas produzidas em laboratório e das bebidas comerciais de maçã... ..	27
5.2.3.1. Análise isotópica do suco concentrado clarificado e do suco concentrado polposo de maçã - δa	27
5.2.3.2. Análise isotópica do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado e do suco concentrado polposo de maçã - δa	28
5.2.3.3. Análise isotópica da polpa lavada com água e da polpa lavada com acetona extraída dos sucos concentrados polposos de maçã - δa	28
5.2.3.4. Análise isotópica do açúcar de cana - δb	29
5.2.3.5. Análise isotópica das bebidas clarificadas fabricadas em laboratório e das bebidas clarificadas comerciais de maçã - δp	29
5.2.3.6. Análise isotópica das bebidas polposas fabricadas em laboratório e das bebidas polposas comerciais de maçã - δp	29
5.2.3.7. Análise isotópica dos aditivos utilizados em sucos, néctares e refrigerantes comerciais de maçã.....	30

5.2.4. Definição dos melhores parâmetros de δ_a , δ_b e δ_p para quantificar a participação de fonte C_3 em suco clarificado e refrigerante de maçã fabricado em laboratório.....	30
5.2.5. Definição dos melhores parâmetros de δ_a , δ_b e δ_p para quantificar a participação de fonte C_3 em suco polposo e néctar de maçã fabricado em laboratório.....	31
5.2.6. Comparação da mensuração de fonte C_3 entre bebidas de maçã fabricadas sem aditivos e bebidas de maçã fabricadas com aditivos.....	32
5.2.7. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C_3 em sucos, néctares e refrigerantes de maçã fabricados em laboratório.....	33
5.2.8. Concepção do limite de legalidade para sucos clarificados e sucos polposos de maçã.....	34
5.2.9. Concepção do limite de legalidade para néctares de maçã.....	35
5.2.10. Concepção do limite de legalidade para refrigerantes de maçã.....	35
5.2.11. Determinação da legalidade em sucos clarificados e refrigerantes de maçã comerciais.....	35
5.2.12. Determinação da legalidade em sucos polposos e néctares de maçã comerciais.....	36
5.3. Análises energéticas em sucos, néctares e refrigerantes de maçã comerciais.....	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1. Matérias-primas.....	39
6.1.1. Análises físico-químicas dos sucos concentrados de maçã.....	39
6.1.2. Análise isotópica das matérias-primas.....	41
6.2. Suco Clarificado de Maçã.....	44
6.2.1. Produção em laboratório dos sucos clarificados de maçã.....	44
6.2.2. Análises físico-químicas dos sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório.....	45
6.2.3. Análises físico-químicas dos sucos clarificados de maçã comerciais.....	46
6.2.4. Quantificação teórica de fonte C_3 em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório.....	47

6.2.5. Análise isotópica dos sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório.....	48
6.2.6. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C_3 em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório.....	48
6.2.7. Identificação da combinação mais precisa para a mensuração de fonte C_3 em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório.....	52
6.2.8. Comparação da mensuração de fonte C_3 entre sucos clarificados de maçã fabricados sem aditivos e sucos clarificados fabricados com aditivos.....	53
6.2.9. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C_3 em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório.....	54
6.2.10. Concepção do limite de legalidade para sucos clarificados de maçã.....	56
6.2.11. Análise isotópica e determinação da legalidade dos sucos clarificados de maçã comerciais.....	57
6.2.12. Análise energética em sucos clarificados de maçã comerciais.....	60
6.3. Suco Polposo de Maçã.....	62
6.3.1. Produção em laboratório de sucos polposos de maçã.....	62
6.3.2. Análises físico-químicas dos sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.....	63
6.3.3. Análises físico-químicas dos sucos polposos de maçã comerciais.....	64
6.3.4. Quantificação teórica de fonte C_3 em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.....	65
6.3.5. Análise isotópica dos sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.....	66
6.3.6. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C_3 em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.....	67
6.3.7. Identificação da combinação mais precisa para a mensuração de fonte C_3 em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.....	71
6.3.8. Comparação da mensuração de fonte C_3 entre sucos polposos de maçã fabricados sem aditivos e sucos polposos fabricados com aditivos.....	73

6.3.9. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C_3 em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.....	73
6.3.10. Concepção do limite de legalidade para sucos polposos de maçã.....	75
6.3.11. Análise isotópica e determinação da legalidade dos sucos polposos de maçã comerciais.....	75
6.3.12. Análises energéticas em sucos polposos de maçã comerciais.....	78
6.4. Néctar de Maçã.....	80
6.4.1. Produção em laboratório de néctar de maçã.....	80
6.4.2. Análises físico-químicas dos néctares de maçã fabricados em laboratório.....	81
6.4.3. Análises físico-químicas dos néctares de maçã comerciais.....	82
6.4.4. Quantificação teórica de fonte C_3 em néctares de maçã fabricados em laboratório.....	83
6.4.5. Análise isotópica dos néctares de maçã fabricados em laboratório.....	84
6.4.6. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C_3 em néctares de maçã fabricados em laboratório.....	86
6.4.7. Identificação da combinação mais precisa para a mensuração de fonte C_3 em néctares de maçã fabricados em laboratório.....	92
6.4.8. Comparação da mensuração de fonte C_3 entre néctares de maçã fabricados sem aditivos e néctares fabricados com aditivos.....	94
6.4.9. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C_3 em néctares de maçã fabricados em laboratório.....	94
6.4.10. Concepção do limite de legalidade para néctares de maçã.....	97
6.4.11. Análise isotópica e determinação da legalidade dos néctares comerciais de maçã.....	98
6.4.12. Análises energéticas em néctares de maçã comerciais.....	102
6.5. Refrigerante de Maçã.....	104
6.5.1. Produção em laboratório de refrigerantes de maçã.....	104
6.5.2. Análises físico-químicas dos refrigerantes de maçã fabricados em laboratório.....	105

6.5.3. Análises físico-químicas dos refrigerantes de maçã comerciais.....	106
6.5.4. Quantificação teórica de fonte C ₃ em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório.....	106
6.5.5. Análise isotópica dos refrigerantes de maçã fabricados em laboratório...	107
6.5.6. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C ₃ em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório...	108
6.5.7. Identificação da combinação mais precisa para a mensuração de fonte C ₃ em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório.....	112
6.5.8. Comparação da mensuração de fonte C ₃ entre refrigerantes de maçã fabricados sem aditivos e refrigerantes fabricados com aditivos.....	114
6.5.9. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C ₃ em refrigerante de maçã fabricados em laboratório.....	114
6.5.10. Concepção do limite de legalidade para refrigerantes de maçã.....	116
6.5.11. Análise isotópica e determinação da legalidade dos refrigerantes comerciais de maçã.....	118
6.5.12. Análises energéticas em refrigerantes de maçã comerciais.....	121
7. PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES OBTIDAS.....	123
7.1. Suco clarificado de maçã.....	123
7.1.1. Conclusão geral para suco clarificado de maçã.....	124
7.2. Suco polposo de maçã.....	124
7.2.1. Conclusão geral para suco polposo de maçã.....	125
7.3. Néctar de maçã.....	125
7.3.1. Conclusão geral para néctar de maçã.....	126
7.4. Refrigerante de maçã.....	126
7.4.1. Conclusão geral para refrigerante de maçã.....	126
7.5. Conclusão geral do trabalho.....	127
8. REFERÊNCIAS.....	130
APÊNDICE.....	138

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Abundância natural dos isótopos estáveis em átomos %.....	7
2	Razão isotópica absoluta dos padrões internacionais.....	8
3	Características físico-químicas do suco de maçã.....	17
4	Características físico-químicas do refrigerante de maçã.....	19
5	Composição química do suco de maçã.....	22
6	Combinações realizadas entre o enriquecimento isotópico relativo dos sucos concentrados clarificados (δa), açúcar purificado extraído dos sucos concentrados clarificados (δa), açúcar de cana (δb), suco clarificado e refrigerante de maçã fabricado em laboratório (δp) e a fração do açúcar purificado extraído dessas bebidas (δp).....	31
7	Combinações realizadas entre os enriquecimentos isotópicos relativos do suco polposo e do néctar de maçã fabricados em laboratório (δp) e suas frações: polpa lavada com água (δa), polpa lavada com acetona (δa) e o açúcar purificado extraído da bebida fabricada em laboratório (δp).....	32
8	Aditivos utilizados na produção de suco, néctar e refrigerante de maçã.....	33
9	Análises físico-químicas dos sucos concentrados.....	40
10	Participação da glicose na composição dos sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) em sucos concentrados de maçã.....	40
11	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos concentrados e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído dos sucos concentrados.....	42
12	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 nas amostras de açúcares de cana.....	43
13	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 dos aditivos utilizados na produção de sucos, néctares e refrigerantes de maçã.....	44
14	Balanço de massa para sucos clarificados de maçã adicionados com 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0% de açúcar de cana (M/M).....	45
15	Análises físico-químicas dos sucos clarificados fabricados em laboratório.....	46
16	Análises físico-químicas dos sucos comerciais clarificados.....	47

17	Porcentagem de sólidos solúveis procedentes de fonte C_3 , calculada de forma teórica, em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório.....	47
18	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos clarificados fabricados em laboratório e na fração do açúcar purificado extraídos destes sucos.....	48
19	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa), utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado em δa , açúcar cristal em δb e o suco clarificado fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	49
20	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado em δa , açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraído dos sucos clarificados fabricados em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	50
21	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado em δa , açúcar cristal em δb e o suco clarificado fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	51
22	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado em δa , açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraído do suco clarificado fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	52
23	Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C_3 e estimativa de erro nas combinações realizadas de δa e δp em suco clarificado de maçã fabricado em laboratório.....	53
24	Comparação da mensuração de fonte C_3 entre sucos clarificados fabricados sem aditivos e sucos clarificados fabricados com aditivos.....	54
25	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 calculados por meio das equações 4 e 5 em suco clarificado de maçã.....	55

26	Balanço de massa para sucos clarificados de maçã adicionados com 10% de açúcar de cana (M/M).....	56
27	Porcentagem mínima de sólidos solúveis procedentes de fonte C ₃ em sucos clarificados de maçã com adição de 10% de açúcar de cana (M/M).....	57
28	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos clarificados comerciais e na fração do açúcar purificado extraído destes sucos.....	58
29	Quantificação de fonte C ₃ em sucos clarificados de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico mais leve do suco concentrado clarificado de maçã em δa (-27,66‰), o valor isotópico mais leve do açúcar de cana em δb (-13,06‰) e o valor isotópico do suco de maçã comercial em δp	58
30	Quantificação de fonte C ₃ em sucos clarificados de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico médio do suco concentrado clarificado de maçã em δa (-27,45‰), o valor isotópico médio do açúcar de cana em δb (-12,72‰) e o valor isotópico do suco de maçã comercial em δp	59
31	Quantificação de fonte C ₃ em sucos clarificados de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico mais pesado do suco concentrado de maçã comercial em δa (-27,24‰), o valor isotópico mais pesado do açúcar de cana em δb (-12,51‰) e o valor isotópico do suco de maçã comercial em δp	59
32	Composição centesimal de sucos clarificados de maçã comerciais.....	60
33	Comparação entre o valor energético fornecido no rótulo de sucos clarificados de maçã comerciais e os valores estimados do cálculo centesimal, bomba calorimétrica e pela tabela de composição de alimentos.....	62
34	Balanço de massa para sucos polposos de maçã adicionados com 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0% de açúcar de cana (M/M).....	63
35	Análises físico-químicas dos sucos polposos fabricados em laboratório.....	64
36	Análises físico-químicas dos sucos polposos comerciais.....	65
37	Porcentagem de sólidos solúveis procedentes de fonte C ₃ , calculada de forma teórica, em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.....	65
38	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos polposos fabricados em laboratório e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído destes sucos.....	66

39	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o suco polposo fabricados em laboratório em δ_p na equação da diluição isotópica.....	68
40	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o açúcar purificado extraídos dos sucos polposos fabricados em laboratório em δ_p na equação da diluição isotópica.....	69
41	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o suco polposo fabricados em laboratório em δ_p na equação da diluição isotópica.....	70
42	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o açúcar purificado extraídos dos sucos polposos em δ_p na equação da diluição isotópica.....	71
43	Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C_3 e estimativa de erro nas combinações realizadas de δ_a e δ_p em suco polposo de maçã fabricado em laboratório.....	72
44	Comparação da mensuração de fonte C_3 entre sucos polposos fabricados sem aditivos e sucos polposos fabricados com aditivos.....	73
45	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 calculados por meio das equações 4 e 5 em suco polposo de maçã.....	74
46	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos polposos comerciais e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído destes sucos.....	76

47	Quantificação de fonte C ₃ em sucos polposos de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos de maçã comerciais em δa , o valor isotópico mais leve do açúcar de cana em δb (-13,06‰) e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos comerciais em δp	76
48	Quantificação de fonte C ₃ em sucos polposos de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos de maçã comerciais em δa , o valor isotópico médio do açúcar de cana em δb (-12,72‰) e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos comerciais em δp	77
49	Quantificação de fonte C ₃ em sucos polposos de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos de maçã comerciais em δa , o valor isotópico mais pesado do açúcar de cana em δb (-12,51‰) e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos comerciais em δp	77
50	Composição centesimal de sucos polposos de maçã comerciais.....	78
51	Comparação entre o valor energético fornecido no rótulo de sucos polposos de maçã comerciais e os valores estimados do cálculo centesimal, bomba calorimétrica e tabela de composição de alimentos.....	80
52	Balanço de massa para néctares de maçã produzidos com 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80% (M/M) de suco polposo a 10,5°Brix.....	81
53	Análises físico-químicas dos néctares fabricados em laboratório.....	82
54	Análises físico-químicas dos néctares de maçã comerciais.....	83
55	Porcentagem de sólidos solúveis procedentes de fonte C ₃ , calculada de forma teórica, em néctares de maçã fabricados em laboratório.....	84
56	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em néctares fabricados em laboratório e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído dos néctares.....	85
57	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C ₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água extraída do néctar fabricado em laboratório em δa , açúcar cristal em δb e o néctar fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	87

58	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o açúcar purificado extraído dos néctares em δ_p na equação da diluição isotópica.....	88
59	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o néctar fabricado em laboratório em δ_p na equação da diluição isotópica.....	90
60	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o açúcar purificado em δ_p na equação da diluição isotópica.....	91
61	Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C_3 e estimativa de erro nas combinações realizadas de δ_a e δ_p em néctar de maçã fabricado em laboratório.....	93
62	Comparação da mensuração de fonte C_3 entre néctares fabricados sem aditivos e néctares fabricados com aditivos.....	94
63	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 calculados por meio das equações 4 e 5 em néctares de maçã.....	96
64	Balanço de massa para néctares de maçã adicionados com 30% de suco de maçã polposo (M/M).....	97
65	Porcentagem mínima de sólidos solúveis procedentes de fonte C_3 em néctares de maçã com adição de 30% de suco polposo de maçã (M/M).....	98
66	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em néctares comerciais e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído destes néctares.....	99
67	Quantificação de fonte C_3 em néctares de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares de maçã comerciais em δ_a , o valor isotópico mais leve do açúcar de cana em δ_b (-13,06‰) e o açúcar purificado extraído do néctar comercial em δ_p	100

68	Quantificação de fonte C_3 em néctares de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares de maçã comerciais em δa e o valor isotópico médio do açúcar de cana em δb (-12,72‰) e o açúcar purificado extraído do néctar comercial em δp	100
69	Quantificação de fonte C_3 em néctares de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares de maçã comerciais em δa e o valor isotópico mais pesado do açúcar de cana em δb (-12,51‰) e o açúcar purificado extraído do néctar comercial em δp	101
70	Composição centesimal de néctares de maçã comerciais.....	102
71	Comparação entre o valor energético fornecido no rótulo dos néctares de maçã comerciais e os valores estimados do cálculo centesimal e bomba calorimétrica.....	103
72	Balanço de massa para refrigerantes de maçã produzidos com 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10% (V/V) de suco clarificado (padrão para refrigerante) a 10°Brix.....	104
73	Análises físico-químicas dos refrigerantes fabricados em laboratório.....	105
74	Análises físico-químicas dos refrigerantes comerciais de maçã.....	106
75	Porcentagem de sólidos solúveis procedentes de fonte C_3 , calculada de forma teórica, em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório.....	107
76	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em refrigerantes fabricados em laboratório e na fração do açúcar purificado extraídos destes refrigerantes	108
77	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado para refrigerante em δa , açúcar cristal em δb e o refrigerante fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	109
78	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado para refrigerante em δa , açúcar cristal em δb e o refrigerante fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	110

79	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C ₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado para refrigerante em δa , açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	111
80	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C ₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado para refrigerante em δa , açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.....	112
81	Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C ₃ e estimativa de erro nas combinações realizadas de δa e δp em refrigerante de maçã fabricado em laboratório.....	113
82	Comparação da mensuração de fonte C ₃ entre refrigerantes fabricados sem aditivos e refrigerantes fabricados com aditivos.....	114
83	Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C ₃ calculados por meio das equações 4 e 5 em refrigerantes de maçã.....	116
84	Balanço de massa para refrigerantes de maçã adicionados com 5% de suco de maçã clarificado para refrigerante (V/V)	117
85	Porcentagem mínima de sólidos solúveis procedentes de fonte C ₃ em néctares de maçã com adição de 5% de suco clarificado de maçã para refrigerante (V/V).....	117
86	Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em refrigerantes de maçã comerciais e na fração do açúcar purificado extraído destes refrigerantes.....	118
87	Quantificação de fonte C ₃ em refrigerantes de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico mais leve do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado de maçã para refrigerante em δa (-27,76‰), o valor isotópico mais leve do açúcar de cana em δb (-13,06‰) e o valor isotópico do açúcar purificado extraído dos refrigerantes comerciais em δp	119
88	Quantificação de fonte C ₃ em refrigerantes de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico médio do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado de maçã para refrigerante em δa (-27,58‰), o valor isotópico médio do açúcar de cana em δb (-12,72‰) e o valor isotópico do açúcar purificado extraído dos refrigerantes comerciais em δp	119

89	Quantificação de fonte C ₃ em refrigerantes de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico mais pesado do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado de maçã para refrigerante em δa (-27,41‰), o valor isotópico mais pesado do açúcar de cana em δb (-12,51‰) e o valor isotópico do açúcar purificado extraído dos refrigerantes comerciais em δp	120
90	Composição centesimal de refrigerantes de maçã comerciais.....	121
91	Comparação entre o valor energético fornecido no rótulo dos refrigerantes de maçã comerciais e os valores estimados do cálculo centesimal e bomba calorimétrica.....	122
92	Resumo dos principais resultados obtidos no desenvolvimento da metodologia de análise isotópica de quantificação de carbono C ₃ em suco, néctar e refrigerante de maçã.....	128
93	Bebidas de maçã utilizadas neste trabalho.....	138

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Relação entre a quantidade de fonte C_3 e o °Brix para classificar a legalidade dos sucos clarificados de maçã comerciais.....	60
2	Relação entre a quantidade de fonte C_3 e o °Brix para classificar a legalidade dos sucos polposos de maçã comerciais.....	78
3	Relação entre a quantidade de fonte C_3 e o °Brix para classificar a legalidade dos néctares de maçã comerciais.....	102
4	Relação entre a quantidade de fonte C_3 e o °Brix para classificar a legalidade dos refrigerantes de maçã comerciais.....	121
5	Relação entre a quantidade de fonte C_3 e C_4 observadas em suco, néctar e refrigerante de maçã.....	129

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação		Página
1	Enriquecimento isotópico relativo entre a amostra e o padrão.....	8
2	Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C ₃	11
3	Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C ₄	12
4	Diluição isotópica simples.....	14
5	Diluição isotópica utilizando fatores de correção.....	14
6	°Brix.	25
7	Acidez titulável.....	26
8	<i>Ratio</i>	26
9	Açúcares redutores totais (ART).....	27

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver o método de análise isotópica para a quantificação de fonte C_3 em suco, néctar e refrigerante de maçã. Essas bebidas foram produzidas em laboratório, conforme a legislação brasileira. Também foram produzidos sucos adulterados (quantidade de açúcar de cana acima do permitido), néctares e refrigerantes adulterados (quantidade insuficiente de suco). Nessas bebidas, foram feitas análises de °Brix, pH, acidez titulável, *ratio*, análise energética e análise isotópica. Para as análises isotópicas foi mensurado o enriquecimento isotópico relativo das bebidas de maçã bem como de suas frações (polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído das bebidas de maçã). Com estes resultados foi estimada a quantidade de fonte C_3 pela equação da diluição isotópica. Para determinar a legalidade das bebidas comerciais de maçã foi necessário a criação do limite de legalidade para separar as bebidas que estão de acordo com a legislação brasileira. Os valores da quantificação de fonte C_3 acima do limite de legalidade foram considerados legais. Caso estes valores estejam abaixo deste limite, estes produtos foram considerados adulterados conforme as normas brasileiras. A metodologia desenvolvida para sucos, néctares e refrigerantes de maçã comerciais provou ser eficiente para separar os produtos que estão de acordo com a legislação. Esta metodologia também pode ser aplicada para verificar a legalidade em outras bebidas de frutas comerciais.

Palavras-chave: legislação, adulteração, fruta, comércio, isótopo, IRMS

ISOTOPIC ANALYSIS OF THE CARBON-13 NATURAL VARIATION AND ENERGETIC ANALYSIS IN JUICE, NECTAR AND APPLE SOFT DRINK (*Malus domestica*, Borkh). Botucatu, 2008. 141p. Tese. (Doutor em Agronomia / Energia na Agricultura) Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RICARDO FIGUEIRA

Adviser: Prof. Dr. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO

2. SUMMARY

The goal of this work was to develop an isotopic analysis method to the C_3 source quantification in juice, nectar and apple soft drink. In laboratory, juice, nectar and apple soft drink were produced according to Brazilian legislation. Also adulterated juices (cane sugar quantity up admitted), nectar and soft drink adulterated (insufficient juice quantity) were produced. In these beverages, analysis of °Brix, pH, titratable acidity, ratio, energetic and isotopic analysis were made. For the isotopic analysis, the isotopic enrichment of apple beverages and fractions of this beverages (pulpy washed with water, pulpy washed with acetone and sugar purified extracted of apple beverages) were measured. With these results, the C_3 quantification was estimated by the equation of isotopic dilution. For determine the legality of apple commercial beverages, the creation of legality limit for separate the lawful beverages was necessary. The values of C_3 quantification above the legality limit were considerate lawful. If below of the legality limit were considerates unlawful according to the Brazilian rules. The methodology developed for commercial juices, nectars and apple soft drinks was efficient to separate the lawful beverages. This methodology can be applied for verify the legality in others commercial fruit beverages.

Keywords: legislation, adulteration, fruit, trade, isotope, IRMS

3. INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica*, Borkh) é uma fruta que oferece perspectiva promissora para a industrialização, uma vez que apresenta características favoráveis a esta finalidade e dela podem ser obtidos muitos produtos de boa aceitação. No Brasil, aproximadamente 15% da produção de maçã é transformada em suco, sendo uma parcela desta destinada à exportação. Entre a fruta *in natura* e o suco, a maçã agrega mais de US\$ 30 milhões anuais à receita cambial brasileira (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005).

A preocupação com a saúde elevou a procura por alimentos e bebidas com características nutricionais importantes para a prevenção e controle de doenças. Atualmente, a tendência mundial de consumo é a substituição dos refrigerantes por bebidas mais saudáveis e com apelo à praticidade, gerando uma demanda por produtos naturais, orgânicos e enriquecidos (ESPERANCINI, 2005).

Nas indústrias de sucos de frutas naturais, uma prática comumente conhecida é a adição de açúcar proveniente da cana-de-açúcar em sucos, néctares e refrigerantes. Quando a adição de açúcar ao suco de maçã está acima da quantidade recomendada pela legislação, há redução de custo dos produtos, causando desvantagens econômicas para os produtores honestos que se mantêm em conformidade com a legislação (ROSSMANN, 2001). Os consumidores também são burlados em alguns de seus direitos

como, por exemplo, a garantia que diferentes produtos devem trazer informações claras e adequadas com especificação correta de sua composição, características, qualidade, etc (BRASIL, 1990).

Atualmente, as análises físico-químicas convencionais não determinam a origem botânica dos açúcares empregados na formulação da bebida. Conseqüentemente, a fiscalização dos produtos para verificar se os mesmos encontram-se dentro dos padrões exigidos por lei fica prejudicada.

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

A aplicação desta metodologia em vegetais só foi possível graças a Melvin Calvin, James Bassham e Andrew Bensea, que na década de 50, elucidaram o ciclo fotossintético nos vegetais conhecido como Ciclo de Calvin. Na década de 60, os pesquisadores Marshal Hatch e Rodger Slack descobriram diferentes ciclos fotossintéticos nos vegetais, dividindo-os em três grupos: vegetais de ciclo fotossintético C₃, C₄ e CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), (CONTREIRAS, 1992). Em função destes diferentes ciclos fotossintéticos, observam-se valores de enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) distintos entre plantas com diferentes metabolismos fotossintéticos. (FRITZ; FONTES, 1986).

Esta diferença no enriquecimento isotópico relativo, existente principalmente nos vegetais C₃ e C₄, também é observada nos seus produtos e subprodutos, tornando-se uma ferramenta importante na detecção de adulteração em alimentos e bebidas como, por exemplo, em méis, xaropes, vinagres, etanol, destilados, conhaques, gorduras, óleos, carnes, produtos de laticínios, compostos aromáticos e aditivos. (FRITZ; FONTE, 1986; ROSSMANN, 2001).

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

A importância que a técnica isotópica vem assumindo pode ser avaliada pelo fato de ser a metodologia oficial empregada nos Estados Unidos nas análises de controle de qualidade dos sucos de frutas naturais e na pureza em méis. A União Européia, com a finalidade de detectar a adição de açúcares ao mosto durante a produção do vinho, introduziu um rígido controle de qualidade fundamentado na análise isotópica do etanol e da água extraídos dos vinhos produzidos pelos países da comunidade européia (OLIVEIRA, 2002). Pelo fato de ser um método padronizado, pode-se conseguir valores de reprodutibilidade e repetibilidade com variações isotópicas inferiores a 1‰ (ROSSMANN, 2001).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento do método de análise isotópica que permita mensurar a quantidade de fonte C₃ (produtos de maçã) em suco, néctar e refrigerante de maçã.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Isótopos estáveis

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

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

Isótopos estáveis do carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera e biosfera em proporções quase constantes (Tabela 1). Cada elemento apresenta um isótopo leve dominante: carbono-12 (^{12}C), hidrogênio-1 (^1H), oxigênio-16 (^{16}O), nitrogênio-14 (^{14}N) e enxofre-32 (^{32}S); e um ou mais isótopos pesados: carbono-13 (^{13}C), hidrogênio-2 (^2H), oxigênio-17 (^{17}O), oxigênio-18 (^{18}O), nitrogênio-15 (^{15}N), enxofre-33 (^{33}S), enxofre-34 (^{34}S) e enxofre-36 (^{36}S) (DUCATTI, 2005).

Na natureza, a ocorrência do isótopo pesado, na maioria dos elementos químicos, é menor que seu isótopo mais leve (Tabela 1). Aproximadamente 98,89 átomos % do carbono existente são constituídos por ^{12}C e apenas 1,11 átomos% são de ^{13}C (ROSSMANN, 2001; BOUTTON, 1991a).

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

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

Adaptado: BOUTTON (1991a)

Para realizar as leituras isotópicas, é necessário que a amostra seja transformada em uma forma gasosa. A forma gasosa mais comumente utilizada para a análise do carbono é o CO_2 (DUCATTI, 2005). Apesar da reprodutibilidade e exatidão das mensurações realizadas no espectrômetro de massa de razões isotópicas (IRMS), há restrições quanto ao manuseio e preparo das amostras, exigindo-se qualidade durante sua conversão em gás (combustão completa), a fim de prevenir o fracionamento isotópico (KELLY, 2003). Exatidão, limite de quantificação, linearidade, faixa de trabalho e precisão são parâmetros que devem ser conhecidos num método quantitativo (MARMIROLI et al., 2003).

Na prática, as amostras são analisadas utilizando-se uma referência de laboratório, previamente calibrada, por um dos padrões internacionais (Tabela 2), que apresentam valores próximos a zero. Resultados positivos indicam que a amostra é mais pesada que o referido padrão e resultados negativos indicam que a amostra é mais leve.

Os valores de enriquecimento do carbono-13 são expressos em delta per mil da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) da amostra em relação ao padrão internacional

definido, *PeeDee Belemnite* PDB (DUCATTI et al., 1979). Trata-se de um fóssil carbonatado sólido, da era Cretácea, denominado *Belemnitella americana*, da formação geológica *PeeDee* do Estado norte-americano da Carolina do Sul (Tabela 2), o qual foi empregado inicialmente como padrão por Craig (1957).

Tabela 2. Razão isotópica absoluta dos padrões internacionais.

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

Adaptado: VERKOUTEREN, 2004.

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

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

A simbologia empregada na Equação 1 significa:

- $\delta(\text{amostra, padrão})$ = enriquecimento isotópico relativo da amostra *versus* o padrão, expresso em per mil (‰);
- r = razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e do padrão, respectivamente, (adimensional).

A variação da razão isotópica do carbono e dos demais isótopos estáveis dos elementos químicos do nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e enxofre podem ser mensurados, com excelente precisão, utilizando o espectrômetro de massa de razões isotópicas

(IRMS) (BOUTTON, 1991c). A técnica da espectrometria de massa, na determinação das variações naturais das razões isotópicas do carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), dependendo da área em estudo, admite um desvio-padrão na ordem de 0,2‰ (DUCATTI et al., 1979).

Para os isótopos estáveis do hidrogênio, o padrão internacional é o *Vienna Standard Mean Ocean Water*, abreviadamente V-SMOW. Para os isótopos estáveis do nitrogênio, o padrão aceito é o ar atmosférico, o qual é considerado uma mistura isotópica homogênea na superfície terrestre. Para os isótopos estáveis do enxofre, o padrão considerado é o mineral troilita do mevalorito *Cañon Diablo*, abreviadamente V-CDT. Com relação ao oxigênio, os padrões isotópicos podem ser o V-PDB ou V-SMOW, dependendo da sua aplicação (BARRIE; PROSSER, 1996; VERKOUTEREN, 2004).

4.2. Ciclos fotossintéticos

Três grupos de plantas (C_3 , C_4 e CAM) assimilam de forma diferente o CO_2 atmosférico durante seus ciclos fotossintéticos (CONTREIRAS, 1992). As duas principais vias bioquímicas para a fixação de carbono são as plantas com o ciclo fotossintético de Calvin – Benson (denominado C_3) e as plantas com ciclo fotossintético de Hatch – Slack (denominado C_4). Essa nomenclatura refere-se aos produtos iniciais formados que contém 3 e 4 átomos de carbono, respectivamente (SCHIMEL, 1993). As plantas de interesse, para este trabalho, são dos grupos C_3 e C_4 .

As plantas de ciclo fotossintético C_3 absorvem o CO_2 atmosférico através dos estômatos presentes nas folhas, que é transferido para as células do mesófilo, onde ocorre a síntese orgânica. Este processo é conhecido como ciclo fotossintético de Calvin – Benson. Neste grupo de plantas, a enzima ribulose bifosfato carboxilase oxigenase, conhecida como RuBisCO ou RudPase (CONTREIRAS, 1992, e BOUTTON, 1996) catalisa a reação de redução do CO_2 para 3-fosfoglicerato (3 átomos de carbono). As plantas de ciclo fotossintético C_3 apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ numa faixa de -32‰ a -22‰, com média de -27‰ (VOGEL, 1993, e BOUTTON, 1996). A macieira, laranjeira, videira, arroz e trigo são exemplos de plantas C_3 .

As plantas de ciclo fotossintético C_4 absorvem o CO_2 através dos estômatos por difusão, que passa às células do mesófilo, onde é fixado na forma de HCO_3^- , conhecido como ciclo fotossintético de Hatch – Slack. Este composto reage com fosfoenol-

piruvato (PEP), cuja reação é catalisada pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcarboxilase), formando oxalacetato, que reduzirá a ácido aspártico ou ácido málico - ambos com 4 átomos de carbono (LEHNINGER et al. 1995, BOUTTON, 1996). A PEPcarboxilase discrimina menos $^{13}\text{CO}_2$, resultando em valores de $\delta^{13}\text{C}$ numa faixa de -17‰ a -9‰ , com média de -11‰ (VOGEL, 1993). A cana-de-açúcar, milho e sorgo são plantas do grupo C_4 (CONTREIRAS, 1992).

As vias metabólicas das plantas desses ciclos fotossintéticos apresentam valores de composição isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) distintos entre si e que não se sobrepõem, possibilitando que esses valores sejam utilizados na determinação da fonte de carbono (VOGEL, 1993), diferindo também do valor apresentado pelo CO_2 atmosférico, que é de $-7,5\text{‰}$ (BOUTTON, 1996). Como exemplo prático, pode-se distinguir o açúcar de cana (C_4) do açúcar de beterraba (C_3) (COLL et al., 1980).

A diferença no enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) entre plantas C_3 e C_4 também é encontrada nos seus produtos derivados (suco, açúcar, álcool, etc.), podendo assim determinar com precisão qual a origem botânica do carbono em determinado produto (ROSSMANN, 2001).

4.3. Fracionamento do carbono-13 nas plantas do ciclo fotossintético C_3

Fator de fracionamento isotópico pode ser interpretado como a variação das concentrações das espécies isotópicas participantes em diferentes regiões de um sistema sujeito a um determinado processo físico, químico ou biológico. O fracionamento isotópico ocorre em todo processo de síntese de carboidrato na planta, no processo de fermentação alcoólica, etc (DUCATTI, 2005).

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 Farquhar 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, os valores do enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) entre plantas C_3 e C_4 , diferem entre si (FRITZ; FONTES, 1986; BOUTTON, 1991b).

Processos físicos, químicos e enzimáticos associados à fotossíntese contribuem para o fracionamento isotópico de carbono nas plantas entre os quais a solubilidade do CO_2 em água, hidratação do CO_2 , difusão de CO_2 no ar, difusão de CO_2 em solução aquosa, hidratação espontânea do CO_2 , hidratação do CO_2 catalizado pela anidrase carbônica, carboxilação da PEPcarboxilase ou da RuBisCO (O'LEARY, 1993).

Fatores ambientais (irradiação, déficit da pressão de vapor, umidade do solo, salinidade do solo, fertilização do solo, poluição do ar, altitude, concentração do CO_2 atmosférico) e biológicos (capacidade fotossintética, variação genética, competição, forma de crescimento, estado de desenvolvimento, tempo de cultivo) tem potencial para influenciar a composição isotópica de carbono nas plantas C_3 e C_4 (BOUTTON, 1996).

Fracionamento isotópico por processos ambientais e condições de concentração, provavelmente, ocorrem durante o crescimento normal da planta. O fracionamento isotópico devido a RuBisCO é independente da concentração de CO_2 *in vitro*, independente da temperatura e pouco dependente do pH (O'LEARY, 1993).

A discriminação isotópica do carbono nas plantas C_3 pode ser expressa pelo modelo (BOUTTON, 1996 e O'LEARY, 1993):

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

A simbologia da Equação 2 significa:

- “ δ_{planta} ” = enriquecimento isotópico relativo do tecido vegetal em relação ao padrão (PDB).
- “ δ_{atm} ” = enriquecimento isotópico relativo do CO_2 atmosférico em relação ao padrão (PDB), possuindo um valor modal de $-7,5\%$.
- “a” = difusão do gás carbônico pelos estômatos, onde há diferença nas taxas de difusão do $^{12}\text{CO}_2$ e do $^{13}\text{CO}_2$. Nesta fase, o $^{12}\text{CO}_2$ se difunde mais eficientemente que o $^{13}\text{CO}_2$, por ter menor massa atômica. Para esta etapa, ocorre um fracionamento isotópico, da ordem de $+4,4\%$.

- “b” = incorporação do CO₂ em um composto orgânico no ciclo bioquímico de síntese orgânica, onde a molécula de CO₂, através da ação da enzima RuBP-carboxilase, reage com um composto de 5 carbonos, formando duas moléculas de 3-PGA. Nesta etapa, ocorre grande fracionamento isotópico na ordem de +30‰, resultando novamente no enriquecimento de ¹²CO₂ e diminuição na concentração de ¹³CO₂.
- “p_i/p_a” = relação entre a pressão parcial intercelular de CO₂ (p_i) e a pressão parcial ambiental de CO₂ (p_a). Este parâmetro varia de acordo com a abertura dos estômatos, sendo, portanto, dependente das condições ambientais (temperatura, umidade, radiação solar, etc.).

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

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

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

Assim como na plantas C₃, a discriminação isotópica em plantas C₄ pode ser expressa pela Equação 3 (BOUTTON, 1996; O’LEARY, 1993; FARQUHAR, 1983):

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

A simbologia empregada na Equação 3 significa:

- “δ_{planta}” = enriquecimento isotópico relativo do tecido vegetal em relação ao padrão (PDB).
- “δ_{atm}” = enriquecimento isotópico relativo do CO₂ atmosférico em relação ao padrão (PDB), possuindo valor modal de -7,5‰.
- “a” = representa a difusão do CO₂ pelo estômato, processo que ocorre igualmente em plantas C₃, com valor +4,4‰.

- “ b_4 ” = após entrar pelos estômatos, o CO_2 segue para as células do mesófilo foliar, onde ocorre a passagem do CO_2 para HCO_3^- . Nesta reação as duas formas de carbono CO_2 ($^{13}\text{CO}_2$ e $^{12}\text{CO}_2$), reagem de maneira diferenciada gerando diferença isotópica no produto final. Para esta reação atribui-se um valor $e_4 = -8\%$, ocorrendo aumento da concentração de ^{13}C . Após a formação de HCO_3^- , ainda nas células do mesófilo, ocorre a incorporação desse produto em um transportador (malato ou aspartato) pela ação da enzima PEP-carboxilase. Nestas reações ocorre o fracionamento isotópico com valor $b'_4 = +2\%$. Portanto, o efeito líquido da incorporação do CO_2 em um transportador será expresso por um valor denominado $b_4 = e_4 + b'_4$, ou seja, $b_4 = -6\%$.
- “ ϕ ” = o CO_2 incorporado em uma molécula de malato ou aspartato é transportado para as células da bainha, onde entra no ciclo bioquímico de síntese orgânica idêntico ao ciclo das plantas C_3 . Neste momento, parte do CO_2 , ao invés de entrar neste ciclo, pode retornar para as células do mesófilo podendo ser reincorporado ou retornar à atmosfera. Esta taxa de CO_2 que retorna para as células da bainha já foi estimada em 0,21.
- “ b_3 ” = significa incorporação do CO_2 em um composto orgânico pela ação da RuBP-carboxilase nas células da bainha, na qual ocorre grande fracionamento isotópico, atribuindo-se um valor de $+30\%$, ocorrendo enriquecimento do $^{12}\text{CO}_2$ e diminuição da concentração de $^{13}\text{CO}_2$.
- “ p_i/p_a ” = comentada anteriormente, nos parâmetros de discriminação isotópicas das plantas C_3 .

4.5. Diluição isotópica

O princípio da diluição isotópica é baseado na suposição de que duas fontes com composição isotópica distinta, quando uniformemente misturadas, resultam numa composição que reflete as quantidades relativas dessas fontes (WAREMBOURG, 1993).

Quando houver somente duas fontes isotopicamente diferentes (exemplo: suco de maçã concentrado e açúcar de cana, na elaboração de um suco comercial), utiliza-se os isótopos estáveis de um único elemento químico. A mensuração quantitativa pode ser obtida pela Equação 4, cujo valor de $\delta^{13}\text{C}$ do produto reflete a proporção de ^{13}C de cada fonte (DUCATTI, 2005).

$$\delta a * C_3 + \delta b * C_4 = \delta_{\text{produto}} \quad (4)$$

A simbologia empregada nas equações (4) significa:

- δa = enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) das fontes de carbono C_3 (maçã);
- C_3 = proporção relativa da fonte C_3 ;
- δb = enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) das fontes de carbono C_4 (açúcar de cana);
- C_4 = proporção relativa da fonte C_4 , sendo $C_3 + C_4 = 1$;
- δ_{produto} = enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) do produto formado (bebida).

A Equação 4 pode ficar mais precisa utilizando um fator de correção com base na participação de açúcares da fruta na composição dos sólidos solúveis (Equação 5) (MACRER et al., 1993 e QUEIROZ, 2005). Este fator de correção pode variar em função de diversos fatores intrínsecos da fruta como, por exemplo, variedade e período de maturação (QUEIROZ, 2005).

$$\%C_3 = \frac{B(\delta_{\text{produto}} - \delta b)}{A(\delta a - \delta_{\text{produto}}) + B(\delta_{\text{produto}} - \delta b)} * 100 \quad (5)$$

A simbologia empregada na Equação 5 significa:

- $\%C_3$ = contribuição relativa do carbono da maçã na bebida;
- δa = enriquecimento isotópico relativo da fonte de carbono C_3 (maçã);
- δ_{produto} = enriquecimento isotópico relativo ($\delta^{13}\text{C}$) do produto formado (bebida);
- δb = enriquecimento isotópico relativo da fonte C_4 (açúcar de cana);
- A = relação do valor de açúcar da fruta / °Brix da fruta (adimensional);
- B = relação do valor de açúcar de cana / °Brix do açúcar de cana (adimensional).

O princípio da Equação 5 é semelhante às relações das misturas isotópicas efetuadas com a razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ em água doce e água do mar (CRISS, 1999).

4.6. Aplicações dos isótopos estáveis em alimentos e bebidas

O combate à adulteração em alimentos e bebidas é um grande desafio para o mercado mundial. Assim como produtos fraudulentos possuem sofisticadas formulações de imitações, as metodologias atuais de detecção se tornaram obsoletas. Atualmente, a adulteração em sucos de frutas, envolvendo a adição de açúcar provido da cana-de-açúcar é um dos temas mais estudado na área da tecnologia de bebidas. Nestes trabalhos, o método isotópico é amplamente divulgado como sendo a única forma de diferenciar o açúcar da própria fruta do açúcar adicionado ilegalmente. Por isso, vários trabalhos realizados com laranja (BRICOUT; KOZIET, 1987; DONER et al., 1987; HOUEROU et al., 1999; ANTOLOVICH et al., 2001; QUEIROZ, 2005), limão (GONZALEZ et al., 1998), abacaxi (GONZALEZ et al., 1999) e suco de maçã e derivados (DONER et al., 1980; JAMIN et al., 1997; JAMIN et al., 2000; KELLY et al., 2003) utilizam o método isotópico para fundamentar suas conclusões.

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 exatos em suas análises quanto à pureza do mel. Estes autores comprovaram que méis de plantas C_3 produzidos próximos a usinas de açúcar e álcool, apresentavam valores em suas razões isotópicas que indicavam a presença de açúcar de cana. Porém, esta possível adulteração não era proveniente dos produtores, e sim devido à presença da cana-de-açúcar na região, sendo que as abelhas faziam o uso do açúcar proveniente dos colmos de cana cortada.

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 (GIMÉNEZ-MIRALES et al., 1999). Estes autores relatam ainda que, através das análises das razões isotópicas de carbono e hidrogênio do álcool dos vinhos é possível determinar a região de origem da bebida.

Guillou et al. (1999) analisaram a adição de açúcar em suco de laranja, abacaxi e uva, importados de Israel, Brasil e Indonésia pela Comunidade Comum Européia. Os resultados obtidos mostraram que os sucos oriundos do Brasil e de Israel não apresentaram

a adição de açúcar, mas em algumas amostras de sucos da Indonésia foram observadas a adulteração com açúcar. A adulteração pode não ocorrer no país de origem do produto, e sim nas empresas distribuidoras, desta maneira, não basta exigir dos países de origem a qualidade do produto, mas também há a necessidade de investigar as empresas que distribuem o produto.

Oliveira (2002) analisou amostras de café, vinho, vodka e cerveja e comparou o valor isotópico com o preço destas bebidas. O autor utilizou o isótopo estável do carbono para identificar a porcentagem de plantas de ciclo C_3 e C_4 dessas bebidas.

O Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciências da Vida (CIE) do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu, utiliza-se da diferença isotópica na origem botânica do álcool (plantas C_3 vs. plantas C_4) na identificação da adulteração de vinhos e fermentados nacionais. Essa metodologia foi adotada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para mensurar fraude em vinhos, vinagres de vinho, fermentados de maçã, fermentados de laranja, fermentados de cana e outros; também auxilia no controle de qualidade das matérias-primas e produtos das indústrias de vinagres e viti-vinícolas nacionais. O CIE é um laboratório credenciado pelo MAPA para proceder análises isotópicas e emitir laudos oficiais nos produtos citados (BRASIL, 2001).

4.7. Legislação brasileira sobre suco, néctar e refrigerante de maçã

O registro, padronização, inspeção e fiscalização da produção e do comércio de bebidas, em relação a seus aspectos tecnológicos, competem ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1997).

4.7.1. Suco de maçã

Suco de maçã é a bebida não fermentada e não diluída obtida da parte comestível da maçã, através de processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

O suco não poderá conter substâncias estranhas à fruta, sendo proibida a adição de aromas e corantes artificiais. Não será permitida a associação de açúcares e edulcorantes hipocalóricos e não calóricos na fabricação do suco (BRASIL, 1997).

De acordo com a legislação brasileira, o suco de maçã deve apresentar as seguintes características físico-químicas (Tabela 3):

Tabela 3. Características físico-químicas do suco de maçã.

	Mínimo	Máximo
Sólidos solúveis em °Brix, a 20°C	10,5	-
Acidez total expressa em ácido málico (g/100g)	0,15	-
Açúcares totais naturais da maçã (g/100g)	-	13,5
Acidez volátil em ácido acético (g/100g)	-	0,04
Aroma e Sabor	próprio da fruta	
Cor	branco a translúcido	

Adaptado: BRASIL (1997)

4.7.2. Suco integral

É o suco sem adição de açúcar, na sua concentração natural, sendo vetada o uso de tal designação para o suco reconstituído (BRASIL, 1997).

4.7.3. Suco de fruta

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

4.7.4. Suco concentrado

Sucos concentrados e desidratados adoçados, quando reconstituídos, deverão conservar os valores de sólidos solúveis originais do suco integral, ou o valor mínimo de sólidos solúveis estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco excetuado o percentual de açúcares adicionados (BRASIL, 1997).

No suco parcialmente desidratado, pode ser adicionado açúcar na quantidade máxima fixada para cada tipo de suco, através de ato administrativo, observado o percentual máximo de 10% (dez por cento) em peso, calculado em gramas de açúcar por cem gramas de suco (BRASIL, 1997).

4.7.5. Suco reconstituído

É o suco obtido pela diluição de suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao valor de sólido solúvel mínimo estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco integral, sendo obrigatório constar de sua rotulagem, a origem do suco utilizado para sua elaboração, se concentrado ou desidratado, sendo opcional o uso da expressão "reconstituído" (BRASIL, 1997).

4.7.6. Refresco ou bebida de fruta

É a bebida não gaseificada, não fermentada, obtida pela diluição, em água potável, do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal de sua origem, com ou sem açúcar (BRASIL, 2000), devendo conter no mínimo 20% (V/V) de suco de maçã (BRASIL, 1997).

4.7.7. Néctar de maçã

É a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal e açúcares, podendo ser adicionada de ácidos, e destinada ao consumo direto (BRASIL, 1997).

O néctar cuja quantidade mínima de polpa de uma determinada fruta não tenha sido fixada em Regulamento Técnico específico deve conter, no mínimo, 30% (M/M) da respectiva polpa (BRASIL, 2003a).

Não será permitida a associação de açúcares e edulcorantes hipocalóricos e não-calóricos na fabricação de néctar (BRASIL, 1997).

4.7.8. Refrigerante de maçã

Refrigerante é a bebida gaseificada obtida pela dissolução em água potável, de suco de sua origem, adicionada de açúcares. A sacarose (açúcar refinado ou cristal) poderá ser substituída totalmente ou parcialmente por sacarose invertida, frutose, glicose e seus xaropes (BRASIL, 1998).

O refrigerante de maçã deve conter, no mínimo, cinco por cento em volume de suco de maçã. Em relação aos aromatizantes, aditivos e coadjuvantes de

tecnologia/elaboração poderão ser utilizados os aprovados em legislação específica (BRASIL, 1998).

As características físico-químicas do refrigerante de maçã estão representadas na Tabela 4 (BRASIL, 1998).

Tabela 4. Características físico-químicas do refrigerante de maçã

	Mínimo	Máximo
Suco de maçã, no mínimo com 10°Brix, %(V/V)	5	-
Açúcar	-	qsp*
Acidez titulável em ácido málico (g/100ml)	0,02	-

*quaisquer que seja a proporção

4.8. A maçã

Originária das montanhas da Ásia, a macieira é uma frutífera de clima temperado, de história milenar, da família *Rosaceae* (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005). Os primeiros registros na literatura sobre o uso da maçã para o consumo humano datam de, pelo menos, 200 anos a.C., sendo que, os principais centros de sua origem são o Cáucaso e o oeste da China (DENARDI; CAMILO, 1997). Estas regiões se caracterizam por ter clima temperado, com invernos de baixas temperaturas, importantes para o repouso hibernar da macieira. As cultivares comerciais de macieiras plantadas em regiões de clima frio originam-se de espécies procedentes da Ásia, incluindo cultivares de Gala, Golden delicious e Fuji, as quais compõem mais de 90% da produção brasileira de maçã (DENARDI; CAMILO, 1997).

Em relação aos aspectos nutricionais, a maçã contém significativas quantidades de compostos fitoquímicos (moléculas bioativas com atividade antioxidante). A epiderme, em particular, é rica em quercetina, a qual é reconhecidamente um forte antioxidante e, portanto, anticarcinogênico (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005). Face à elevada atividade antioxidante, os autores Lee; Smith (2000) sugerem que as pessoas devem consumir, pelo menos, uma maçã por dia, a fim de aumentar o conteúdo antioxidante de sua dieta.

4.9. Comércio da maçã e derivados

No ano de 2005, a produção mundial de maçã foi estimada em 43 milhões de toneladas. Neste cenário, com 25% de toda produção mundial, a China desenvolve-se, cada vez mais, em quantidade e qualidade. Em 2005, a participação do Brasil na produção de maçã foi de 2 a 2,3%. As mais recentes análises indicam que, nesta década, a produção mundial de maçã deverá prosseguir com taxa de crescimento superior a da população mundial (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005).

Com relação ao suco de maçã, em 2001, o consumo mundial de suco foi de 12 bilhões de litros, metade dos quais apenas na Alemanha e Estados Unidos. Novamente a China, com aproximadamente 25% da exportação (219.000 toneladas), aparece como maior produtor mundial de suco de maçã (BRAUN, 2003).

O maior pólo produtor de maçã no Brasil, Fraiburgo, localiza-se na região serrana de Santa Catarina. Desde 1977 a 2002, esta região manteve uma produção média de 52 a 54% do total brasileiro produzido e, em 2005, a safra nacional foi de 1.050.000 toneladas (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005). Deste total, 30% das maçãs, cujo sabor e a aparência deixam a desejar para o consumo *in natura*, são processadas pelas indústrias (KENNEDY; KROUSE, 1999 e WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2002). É oportuno salientar que, devido a grande produção das variedades Gala e Fuji, as maçãs industriais compreendem as frutas desqualificadas destas cultivares e de todas as utilizadas como polinizadoras (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005).

4.10. Valor energético de bebidas

Caloria é a quantidade de energia necessária para aumentar a temperatura de um grama de água de 14,5°C para 15,5°C. De forma generalizada, pode-se dizer que é a quantidade de energia necessária para elevar em 1° Celsius a temperatura de um grama de água (1 caloria = 4,186 *Joule*) (CALORIMETRIA, 2006). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define caloria como sendo a energia proveniente dos alimentos que o nosso corpo utiliza para a manutenção da vida e reprodução. As calorias são calculadas a partir da quantidade de gorduras, proteínas e carboidratos presentes nos alimentos (BRASIL, 2003b).

Um *Joule* é o trabalho realizado por uma força constante de 1 Newton que desloca seu ponto de aplicação em 1 metro na sua direção. Esta unidade é utilizada pelo Sistema Internacional de Medidas como unidade oficial para expressar as grandezas de trabalho, energia ou quantidade de calor. Apesar do valor energético ou calórico dos alimentos ser expresso em calorias, o *Joule* (J) é a medida utilizada pelo Sistema Internacional.

São três as formas de se determinar o valor energético de um alimento: bomba calorimétrica, composição centesimal e pela tabela de composição de alimentos.

4.10.1. Bomba calorimétrica

A bomba calorimétrica consiste em um cilindro metálico hermeticamente fechado, onde a amostra é colocada em recipiente com pressão entre 25 a 30 atmosferas de oxigênio. A combustão é feita através de um circuito elétrico que determina a queima de um fusível, que se encontra em contato com a amostra, liberando uma faísca elétrica para início da combustão. Visto que a bomba calorimétrica é mergulhada num recipiente com 2000 gramas de água destilada, em condições adiabáticas, a combustão da amostra provoca a elevação da temperatura da água na qual a bomba se acha imersa. Medindo-se a elevação da temperatura da água e conhecendo-se o equivalente hidrotérmico da bomba (correções para a energia liberada pela oxidação do fusível e produção de gases) calcula-se a energia bruta da amostra (SILVA, 1990).

4.10.2. Composição centesimal

Para expressar a composição química de uma bebida utiliza-se a análise centesimal (%), na qual os componentes básicos são: umidade, proteína, lipídio, carboidrato e cinzas (OETTERER, 2006). A partir dos resultados das análises, é feito cálculo para a obtenção do valor calórico da bebida, por meio da conversão: carboidratos 4 kcal g⁻¹; proteínas 4 kcal g⁻¹ e lipídios 9 kcal g⁻¹ (BRASIL, 1999).

4.10.3. Tabela de Composição de Alimentos

A Tabela de Composição de Alimentos fornece informações sobre a composição química de alimentos e bebidas como, por exemplo, a quantidade de proteína,

lipídio, cinzas, carboidratos, energia, etc. A Tabela 5 informa os dados da composição química de suco de maçã segundo o *United States Department of Agriculture* (USDA).

A rotulagem nutricional se aplica aos alimentos e bebidas produzidos, embalados na ausência do cliente e prontos para serem oferecidos aos consumidores, sendo no Brasil regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003b).

Tabela 5. Composição química do suco de maçã.

Componentes	Unidades	Valor por 200 gramas
Água	g	175,86
Energia	kcal	86,00
Energia	kJ	359,00
Proteína	g	0,12
Lipídio total (gordura)	g	0,22
Cinzas	g	0,44
Carboidrato (por diferença)	g	23,36

Adaptado: United States Department of Agriculture - USDA (2008).

5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1. Materiais

5.1.1. Matérias-primas

Para este trabalho foram analisadas as seguintes matérias-primas:

- duas amostras de suco de maçã concentrado polposo, três amostras de suco de maçã concentrado clarificado e duas amostra de suco de maçã concentrado clarificado (padrão para refrigerantes) fornecidos pelas próprias indústrias de bebidas de maçã;
- vinte marcas de açúcares (cristal, refinado, líquido, invertido, xarope de caramelo, glacê e demerara) fornecidos pelas próprias indústrias de bebidas de maçã;
- sete tipos de aditivos, permitidos pela legislação brasileira, como ácido cítrico, ácido ascórbico, pectina, benzoato de sódio, goma xantana, corante de caramelo e aroma de maçã, fornecidos pelas próprias indústrias de bebidas de maçã.

5.2. Método

5.2.1. Obtenção de bebidas padrão e de bebidas adulteradas de maçã

A partir das matérias-primas (suco de maçã concentrado polposo, suco de maçã concentrado clarificado, suco de maçã concentrado clarificado para refrigerante e açúcar de cana), foram produzidos, em laboratório, suco, néctar e refrigerante de maçã de acordo com a legislação brasileira (bebidas padrão). Também foram produzidos sucos adulterados com quantidade de açúcar de cana acima do permitido pela legislação brasileira (>10% M/M); néctares com quantidade insuficiente de suco polposo (<30% M/M) e refrigerantes com quantidade insuficiente de suco clarificado (<5% V/V).

5.2.1.1. Produção em laboratório do suco de maçã clarificado e polposo

Com o suco de maçã concentrado clarificado, suco de maçã concentrado polposo e água foram produzidos, em laboratório, sucos de maçã com concentração de sólidos solúveis inicial em 10,5°Brix. Em seguida, foram adicionadas quantidades crescentes de 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0% de açúcar de cana (M/M). A partir dos resultados deste balanço de massa foi possível calcular, utilizando a Equação 6, a quantidade teórica de fonte C₃ (% sólidos solúveis do suco clarificado ou polposo) nas amostras de sucos clarificados e sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.

5.2.1.2. Produção em laboratório de néctar de maçã

A partir do suco de maçã concentrado polposo, água e açúcar de cana foram produzidos, em laboratório, néctares de maçã com concentração de sólidos solúveis final em 12°Brix (menor valor encontrado nos produtos comerciais). Estes produtos foram fabricados com 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80% (M/M) de suco reconstituído polposo a 10,5°Brix. A partir dos resultados deste balanço de massa foi possível calcular, utilizando a Equação 6, a quantidade teórica de fonte C₃ (% sólidos solúveis do suco polposo) nas amostras de néctares de maçã fabricados em laboratório.

5.2.1.3. Produção em laboratório de refrigerante de maçã

Utilizando o suco de maçã concentrado clarificado (padrão para refrigerante), água e açúcar de cana, foram produzidos, em laboratório, refrigerantes de maçã com concentração de sólidos solúveis final em 10,4°Brix (menor valor encontrado nos produtos comerciais). Os refrigerantes foram fabricados com quantidades crescentes de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10% (V/V) de suco reconstituído clarificado (padrão para refrigerante) a 10°Brix. A partir dos resultados deste balanço de massa foi possível calcular, utilizando a Equação 6, a quantidade teórica de fonte C₃ (% sólidos solúveis do suco clarificado para refrigerante) nas amostras de refrigerantes de maçã fabricados em laboratório.

5.2.2. Análises físico-químicas das matérias-primas, dos sucos, néctares e refrigerantes produzidos em laboratório e dos produtos comerciais de maçã

No Laboratório de Bebidas da Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP/Botucatu, as matérias-primas de maçã, os sucos, néctares e refrigerantes produzidos em laboratório e os produtos de maçã comerciais, foram analisados em triplicata em relação ao °Brix, pH, acidez titulável e *ratio*. Além disso, nos sucos concentrados de maçã também foram feitas análises de açúcares redutores totais (ART).

- **°Brix**

Para a análise de °Brix (Equação 6), as amostras foram clarificadas em centrífuga de bancada (ALC PK 110), a 4500rpm (1610g), durante 5 minutos e inseridas no densímetro digital (Densímetro Digital Mettler KEM DA-310) para a leitura de densidade (D_{20/20}). O valor da densidade foi convertido para °Brix através do uso da tabela apropriada.

$$^{\circ}\text{Brix} = \frac{\text{Massa de Sólidos Solúveis}}{\text{Massa da Solução}} * 100 \quad (6)$$

- **pH**

A leitura do pH foi realizada em peagômetro digital (Micronal B474).

- **Acidez Titulável**

Para determinar a acidez titulável (Equação 7), foram adicionados 10mL da bebida de maçã em 100mL de água. Esta solução foi colocada em peagômetro digital sob agitação e titulado NaOH (0,1N) até obter a leitura 8,2. Os resultados foram expressos em gramas de ácido málico por 100 gramas de amostra.

$$\text{Acidez Titulável} = \frac{N * V * 67}{V_a * 1000} * 100 \quad (7)$$

A simbologia da Equação 7 significa:

- N = normalidade da soda;
- V = volume médio de NaOH titulado (mL);
- 67 = número de equivalente grama do ácido málico (C₄O₅H₆);
- V_a = volume da bebida de maçã utilizada (10mL).

- **Ratio**

É a razão entre °Brix e acidez titulável, conforme a Equação 8. Os resultados destas análises são adimensionais.

$$\text{Ratio} = \frac{^{\circ}\text{Brix}}{\text{Acidez Titulável}} \quad (8)$$

- **Açúcares Redutores Totais (ART)**

A quantificação dos açúcares redutores totais (Equação 9) foi realizada somente nos sucos concentrados clarificados, sucos concentrados polposos e no suco concentrado clarificado para refrigerante pelo método de Lane-Eynon, utilizando solução de Fehling (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995). Os resultados de ART foram transformados para gramas de glicose / 100gramas de amostra, para determinar a porcentagem de ART em função do °Brix dos sucos concentrados.

$$\text{ART} = \frac{T * D * 1000}{V} \quad (9)$$

A simbologia da Equação 9 significa:

- T = título do licor de Fehling (0,00555);
- D = fator de diluição da amostra;
- V = volume médio da amostra utilizada (mL).

5.2.3. Análise isotópica das matérias-primas, das bebidas produzidas em laboratório e das bebidas comerciais de maçã

Para realizar as análises isotópicas, foi necessário que as matérias-primas, as bebidas produzidas em laboratório e as bebidas comerciais de maçã fossem preparadas para as leituras no Espectrômetro de Massa. No caso dos sucos polposos e néctares de maçã, pode-se analisar a própria bebida e mais três frações: polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e o açúcar purificado extraído da bebida. Já nas bebidas clarificadas (suco clarificado e refrigerante de maçã), por não conter polpa em sua composição, a análise isotópica somente é feita nas bebidas clarificadas e no açúcar purificado extraído das bebidas clarificadas.

5.2.3.1. Análise isotópica do suco concentrado clarificado e do suco concentrado polposo de maçã - δa

Para a análise isotópica do suco concentrado clarificado e do suco concentrado polposo de maçã, 0,35 μ L de cada suco foi acondicionado em cápsulas de estanho contendo CHROMOSORB W, empacotadas e colocadas no Analisador Elemental (EA 1108 – CHN – Fisons Elemental Analyzer) para serem queimadas (*flash* combustão) a 1020°C liberando CO₂. Este gás é comparado com o CO₂ padrão para a determinação do $\delta\%^{13}\text{C}$ no Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (Delta S Finnigan Mat).

5.2.3.2. Análise isotópica do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado e do suco concentrado polposo de maçã - δa

Na análise isotópica de carbono-13 dos açúcares contidos nos sucos concentrados clarificados e nos sucos concentrados polposos de maçã, foi utilizada a metodologia de extração e purificação proposta por Koziet et al. (1993). Nesta metodologia, 100ml do suco de maçã foi centrifugado a 4500rpm (1610g) durante 5 minutos para a separação dos sólidos insolúveis. Em seguida, ao líquido sobrenadante, foi adicionado 4g de hidróxido de cálcio (Pa), e aquecido a 90°C, sendo novamente centrifugado, nas mesmas condições, para retirar os ácidos orgânicos. Adicionou-se ácido sulfúrico a 2N ao líquido sobrenadante até corrigir o pH para 5 e, em seguida, o líquido foi novamente aquecido até atingir a temperatura de 90°C. Após o resfriamento à temperatura ambiente, a amostra foi mantida a 4°C por 12h, para remoção do excesso de cálcio. Neste período ocorreu a formação de CaSO₄ o qual foi desprezado. O sobrenadante (solução açucarada) foi preparado para ser injetado no Analisador Elementar conforme descrito no item 5.2.3.1.

5.2.3.3. Análise isotópica da polpa lavada com água e da polpa lavada com acetona extraída dos sucos concentrados polposos de maçã - δa

Uma alíquota de 100mL suco concentrado polposo foi centrifugada a 4500rpm (1610g) durante 5 minutos para separação dos sólidos insolúveis. A polpa (sólido insolúvel), depositada no fundo do tubo da centrífuga, recebeu 20mL de água destilada e agitada durante 1 minuto para a suspensão dos sólidos insolúveis. Em seguida, o volume do tubo foi completado para 50mL com água destilada e, novamente, centrifugado a 4500rpm (1610g) durante 5 minutos. Repetiu-se este procedimento por mais quatro vezes (°Brix = zero). Ao final deste procedimento, obteve-se a fração de polpa lavada com água.

Na metodologia proposta por Rossmann et al. (1997), os sólidos insolúveis (polpa) passam por tratamento com acetona para eliminar os carotenóides, uma vez que estes podem interferir no enriquecimento isotópico relativo.

Para a obtenção da polpa lavada com acetona, seguiu o mesmo procedimento da polpa lavada com água. Após as cinco lavagens com água, foram adicionados 30mL de acetona pura. A amostra foi agitada em agitador magnético durante 1

minuto, completada com 20mL de água e novamente centrifugada nas condições já citadas. Repetiu-se mais uma vez este procedimento e, em seguida, foram feitas mais duas lavagens com água destilada. Ao final deste procedimento, obteve-se a fração de polpa lavada com acetona.

As amostras das frações da polpa lavada com água e da polpa lavada com acetona foram transferidas para tubos *ependorffs*, liofilizadas e preparadas para serem colocadas no Analisador Elementar conforme citado no item 5.2.3.1.

5.2.3.4. Análise isotópica do açúcar de cana - δb

As amostras líquidas do açúcar de cana foram diluídas com água destilada até a concentração de 10°Brix. Após este procedimento, foram transferidas para tubos *ependorffs*, e colocadas no Analisador Elementar conforme citado no item 5.2.3.1.

Para as amostras granuladas de açúcar, estas foram moídas em moinho criogênico de nitrogênio líquido (Spex CertiPrep 6750 Freezer/Mill) durante três minutos a temperatura de -196°C para obter um material com textura fina ($\leq 65\mu\text{m}$) e homogênea. Cada amostra (0,03mg) foi colocada em cápsulas de estanho para serem colocadas no Analisador Elementar conforme descrito no item 5.2.3.1.

5.2.3.5. Análise isotópica das bebidas clarificadas fabricadas em laboratório e das bebidas clarificadas comerciais de maçã - δp

Para as bebidas clarificadas fabricadas em laboratório e para as bebidas clarificadas comerciais de maçã, as metodologias utilizadas na preparação das análises isotópicas estão descritas nos itens 5.2.3.1 e 5.2.3.2.

5.2.3.6. Análise isotópica das bebidas polposas fabricadas em laboratório e das bebidas polposas comerciais de maçã - δp

Para as bebidas polposas fabricadas em laboratório e para as bebidas polposas comerciais de maçã, as metodologias utilizadas nas preparações das análises isotópicas estão descritas nos itens 5.2.3.1, 5.2.3.2 e 5.2.3.3.

5.2.3.7. Análise isotópica dos aditivos utilizados em sucos, néctares e refrigerantes comerciais de maçã

As amostras líquidas e as amostras granuladas dos aditivos utilizados na fabricação de sucos, néctares e refrigerantes comerciais de maçã seguem a metodologia descrita no item 5.2.3.4.

5.2.4. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C_3 em suco clarificado e refrigerante de maçã fabricados em laboratório

Na fabricação em laboratório do suco clarificado e refrigerante de maçã foram utilizados, como matérias-primas, suco concentrado clarificado (δa), suco concentrado clarificado para refrigerante (δa) e açúcar de cana (δb). Dos sucos concentrados clarificados ainda foi extraída a fração do açúcar purificado (δa).

Do suco clarificado e do refrigerante de maçã fabricados em laboratório (δp), também foi possível analisar isotopicamente a fração do açúcar purificado extraído dessas bebidas (δp). Agrupando os sucos concentrados clarificados e sua fração em δa , açúcar de cana em δb e as bebidas fabricadas em laboratório e suas frações em δp , na equação da diluição isotópica simples ($\delta a * C_3 + \delta b * C_4 = \delta p$) (Equação 4), foi possível combina-las de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6. Combinações realizadas entre o enriquecimento isotópico relativo dos sucos concentrados clarificados (δa), açúcar purificado extraído dos sucos concentrados clarificados (δa), açúcar de cana (δb), suco clarificado e refrigerante de maçã fabricado em laboratório (δp) e a fração do açúcar purificado extraído dessas bebidas (δp).

δa ($\delta^{13}C$)	δb ($\delta^{13}C$)	δp ($\delta^{13}C$)
Suco Concentrado Clarificado	Açúcar de Cana	Bebida Fabricada em Laboratório
Suco Concentrado Clarificado	Açúcar de Cana	Açúcar Purificado Extraído da Bebida Fabricada em Laboratório
Açúcar Purificado Extraído do Suco Concentrado Clarificado	Açúcar de Cana	Bebida Fabricada em Laboratório
Açúcar Purificado Extraído do Suco Concentrado Clarificado	Açúcar de Cana	Açúcar Purificado Extraído da Bebida Fabricada em Laboratório

Mensurando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado, do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado, do açúcar de cana, das bebidas de maçã fabricadas em laboratório e do açúcar purificado extraído das bebidas fabricadas em laboratório, é possível calcular, para cada combinação (Tabela 6), a quantidade de fonte C_3 nas amostras de suco clarificado e nas amostras de refrigerante de maçã fabricado em laboratório (valor prático). Estes resultados foram comparados com a quantidade de fonte C_3 calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis ($^{\circ}Brix$) (valor teórico). A combinação com os resultados práticos mais próximos dos resultados teóricos foi definida para quantificar a concentração de carbono originário de fonte C_3 nos produtos comerciais.

5.2.5. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C_3 em suco polposo e néctar de maçã fabricados em laboratório

Na fabricação em laboratório do suco polposo e néctar de maçã foram utilizados, como matérias-primas, suco concentrado polposo e açúcar de cana (δb). Do suco polposo e do néctar fabricados em laboratório, foi possível analisar isotopicamente a bebida fabricada em laboratório (δp) e mais três frações: polpa lavada com água (δa), polpa lavada com acetona (δa) e o açúcar purificado extraído da bebida fabricada em laboratório (δp). Dessa forma, agrupando a bebida fabricada em laboratório e as suas frações, na equação da diluição

isotópica simples ($\delta a * C_3 + \delta b * C_4 = \delta p$) (Equação 4), foi possível combina-las de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Combinações realizadas entre os enriquecimentos isotópicos relativos do suco polposo e do néctar de maçã fabricados em laboratório (δp) e suas frações: polpa lavada com água (δa), polpa lavada com acetona (δa) e o açúcar purificado extraído da bebida fabricada em laboratório (δp).

δa ($\delta^{13}C$)	δb ($\delta^{13}C$)	δp ($\delta^{13}C$)
Polpa Lavada com Água Extraída da Bebida Fabricada em Laboratório	Açúcar de Cana	Bebida Fabricada em Laboratório
Polpa Lavada com Água Extraída da Bebida Fabricada em Laboratório	Açúcar de Cana	Açúcar Purificado Extraído da Bebida Fabricada em Laboratório
Polpa Lavada com Acetona Extraída da Bebida Fabricada em Laboratório	Açúcar de Cana	Bebida Fabricada em Laboratório
Polpa Lavada com Acetona Extraída da Bebida Fabricada em Laboratório	Açúcar de Cana	Açúcar Purificado Extraído da Bebida Fabricada em Laboratório

Mensurando o enriquecimento isotópico relativo das bebidas fabricadas em laboratório, das frações extraídas destas bebidas fabricadas em laboratório e do açúcar de cana, foi possível calcular, para cada combinação (Tabela 7), a quantidade de fonte C_3 nas amostras de suco polposo e néctar de maçã fabricado em laboratório (valor prático). Estes resultados foram comparados com a quantidade de fonte C_3 calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix) (valor teórico). A combinação com os resultados práticos mais próximos dos resultados teóricos foi definida para quantificar a concentração de carbono originário de fonte C_3 nos produtos comerciais.

5.2.6. Comparação da mensuração de fonte C_3 entre bebidas de maçã fabricadas sem aditivos e bebidas de maçã fabricadas com aditivos

Segundo Queiroz (2005), a inclusão de alguns aditivos permitidos por lei como ácido cítrico, ácido ascórbico, pectina, benzoato de sódio, espessantes, corantes e

aromas, podem falsear o resultado isotópico em produtos comerciais. Para estimar a diferença que estes aditivos podem causar na mensuração de C_3 , foram fabricados produtos com aditivos e comparados estatisticamente com sucos, néctares e refrigerantes produzidos sem aditivos. Esta comparação foi realizada utilizando o Teste t para amostras pareadas com $\alpha < 0,05$ (Vieira, 1980).

As informações dos aditivos utilizados na produção dos sucos, néctares e refrigerantes de maçã, bem como suas quantidades foram obtidas informalmente com as próprias indústrias produtoras de bebidas de maçã (Tabela 8).

Tabela 8. Aditivos utilizados na produção de suco, néctar e refrigerante de maçã.

Aditivo	Função	Suco	Néctar	Refrigerante	Quantidade
Ácido Cítrico	Acidulante	x	x	x	0,23% M/M
Ácido Ascórbico	Antioxidante	x	x	x	0,01% M/M
Aroma de Maçã	Aroma		x	x	0,1% M/M
Goma Xantana	Espessante	x	x		0,04% M/M
Benzoato de Sódio	Conservante		x	x	0,05g/100ml
Pectina	Conservante		x		0,15% M/M
Corante Caramelo	Corante			x	0,06g/100g

Fonte: Dados obtidos de forma verbal das indústrias produtoras de bebidas de maçã (2006-2007)

5.2.7. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C_3 em sucos, néctares e refrigerantes de maçã fabricados em laboratório

A participação de fonte C_3 , em sucos, néctares e refrigerantes de maçã, pode ser quantificada utilizando a Equação 4 (diluição isotópica simples) e a Equação 5 (diluição isotópica com fator de correção).

Para quantificar a participação de fonte C_3 , por meio da Equação 4, foi fixado um valor isotópico para a fonte C_3 (δa) e para a fonte C_4 (δb). Para bebidas clarificadas, adotou-se a média do valor isotópico para a fonte C_3 (δa = suco concentrado de maçã), a média do valor isotópico para a fonte C_4 (δb = açúcar de cana) e o valor isotópico de δp (bebida fabricada em laboratório ou o açúcar purificado extraído de dessas bebidas). Para bebidas com polpa, adotou-se o valor isotópico para a fonte C_3 (δa = polpa lavada com água

ou acetona), a média do valor isotópico para a fonte C₄ (δb = açúcar de cana) e o valor isotópico de δp (bebida fabricada em laboratório ou o açúcar purificado extraído de dessas bebidas).

Na Equação 5, foi empregada a mesma metodologia usada para a Equação 4. Além disso, para o fator de correção (A), foi fixado um fator de correção máximo e um fator de correção mínimo com base na participação dos açúcares da maçã na composição dos sólidos solúveis dos sucos concentrados de maçã.

A equação com os resultados práticos mais próximos dos resultados teóricos ($^{\circ}$ Brix) foi escolhida para quantificar a concentração de carbono C₃ nos produtos comerciais.

5.2.8. Concepção do limite de legalidade para sucos clarificados e sucos polposos de maçã

O limite de legalidade fornece a concentração mínima de fonte C₃ que um suco de maçã deve ter para ser considerado legal, diante a legislação brasileira.

Para determinar a legalidade de sucos clarificados e sucos polposos de maçã comerciais, foi preciso dividi-los em dois grupos: suco adoçado e suco integral.

Para suco de maçã adoçado, foi necessário a criação do limite de legalidade com o objetivo de separar as bebidas que estão de acordo com as normas brasileiras. O limite de legalidade para suco de maçã adoçado foi obtido pela mensuração teórica da quantidade de fonte C₃, calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), em sucos clarificados e sucos polposos de maçã com concentrações de sólidos solúveis iniciais em 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5; 13,0; 13,5 e 14,0 $^{\circ}$ Brix adicionados com 10% de açúcar de cana (quantidade máxima permitida pela legislação brasileira) em relação à massa de cada suco. Os valores do limite de legalidade (quantidade mínima de fonte C₃ permitida pela legislação brasileira) foram plotados em gráfico de dispersão que relaciona esta variável ao $^{\circ}$ Brix destas amostras.

Para suco de maçã integral, necessariamente, esses produtos não podem conter açúcar de cana em sua composição. Neste caso, a quantificação de fonte C₃ será sempre de 100% independentemente do $^{\circ}$ Brix da amostra.

5.2.9. Concepção do limite de legalidade para néctares de maçã

O limite de legalidade fornece a concentração mínima de fonte C_3 que um néctar de maçã deve ter para ser considerado legal, diante a legislação brasileira.

Para determinar a legalidade em néctares comerciais, foi necessária a criação do limite de legalidade com o objetivo de separar as bebidas que estão de acordo com as normas brasileiras. O limite de legalidade foi obtido pela mensuração teórica da quantidade de fonte C_3 , calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), em néctares de maçã com concentrações de sólidos solúveis finais de 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5; 13,0; 13,5; 14,0; 14,5 e 15,0 $^{\circ}$ Brix adicionados com 30% de suco de maçã polposo (menor valor permitido pela legislação brasileira) em relação a massa de cada néctar. Os valores do limite de legalidade (quantidade mínima de fonte C_3 permitida pela legislação brasileira) foram plotados em gráfico de dispersão que relaciona esta variável ao $^{\circ}$ Brix destas amostras.

5.2.10. Concepção do limite de legalidade para refrigerantes de maçã

O limite de legalidade fornece a concentração mínima de fonte C_3 que um refrigerante de maçã deve ter para ser considerado legal, diante a legislação brasileira.

Para determinar a legalidade em refrigerantes comerciais, também foi necessário a criação do limite de legalidade para separar as bebidas que estão de acordo com as normas brasileiras. O limite de legalidade foi obtido pela mensuração teórica da quantidade de fonte C_3 , calculada pelo balanço de massa de sólidos solúveis ($^{\circ}$ Brix), em refrigerantes de maçã com concentrações de sólidos solúveis finais de 10, 11, 12, 13 e 14 $^{\circ}$ Brix adicionados com 5% (V/V) de suco de maçã clarificado (menor valor permitido pela legislação brasileira) a 10 $^{\circ}$ Brix. Calculado os valores do limite de legalidade (quantidade mínima de fonte C_3 permitida pela legislação brasileira) foi confeccionado um gráfico de dispersão que relaciona esta variável ao $^{\circ}$ Brix destas amostras.

5.2.11. Determinação da legalidade em sucos clarificados e refrigerantes de maçã comerciais

Para determinar a legalidade em sucos clarificados e refrigerantes de maçã comerciais, quando não existe padrão interno (polpa), foi calculada uma faixa de quantificação da fonte C_3 para cada produto comercial. Esta faixa foi obtida utilizando três

valores isotópicos como padrões para δa , três valores isotópicos como padrões para δb e um valor isotópico como padrão para δp . Em δa (suco concentrado clarificado ou suco concentrado clarificado para refrigerante) foi utilizado o teor isotópico mais leve, o teor isotópico mais pesado e a média dos teores isotópicos dos sucos concentrados. Para δb (açúcar de cana) foi utilizado o teor isotópico mais leve, o teor isotópico mais pesado e a média dos teores isotópicos dos açúcares de cana. Para δp foi utilizado o valor isotópico da bebida comercial ou o valor isotópico do açúcar purificado extraído da bebida comercial. Os valores isotópicos mais pesados, os valores isotópicos médios e os valores isotópicos mais leves de δa e δb foram agrupados, juntamente com o valor isotópico de δp , na equação da diluição isotópica (Equação 4 ou 5) para, respectivamente, obter a quantificação máxima, média e mínima da fonte C_3 . Dessa forma foi estabelecida uma faixa de quantificação da fonte C_3 para cada produto comercial.

Mensurado os valores da faixa de quantificação da fonte C_3 para sucos clarificados e refrigerantes de maçã comerciais, estes valores foram plotados em gráfico de dispersão relacionando os valores da faixa (quantificação máxima, média e mínima de fonte C_3) com o °Brix das amostras comerciais. Quando toda faixa de quantificação de fonte C_3 estiver acima do limite de legalidade, este produto foi considerado legal. Caso toda a faixa esteja abaixo deste limite, este produto foi considerado adulterado conforme a legislação brasileira. Quando os valores da faixa de quantificação se sobreporem aos valores do limite de legalidade, este produto foi classificado como incerto segundo a sua legalidade.

5.2.12. Determinação da legalidade em sucos polposos e néctares de maçã comerciais

Para determinar a legalidade em sucos polposos e néctares de maçã comerciais, foi calculada uma faixa de quantificação da fonte C_3 para cada produto comercial. Esta faixa foi obtida utilizando um valor isotópico como padrão para δa , três valores isotópicos como padrões para δb e um valor isotópico como padrão para δp . Em δa , como foi possível a análise do padrão interno dos sucos polposos e néctares de maçã, foi utilizado o valor isotópico da polpa lavada com água ou da polpa lavada com acetona. Para δb (açúcar de cana) foi utilizado o teor isotópico mais leve, o teor isotópico mais pesado e a média dos teores isotópicos dos açúcares de cana. Para δp foi utilizado o valor isotópico da bebida

comercial ou o valor isotópico do açúcar purificado extraído da bebida comercial. O valor isotópico da polpa (δ_a) foi agrupado com o valor isotópico mais pesado, o valor isotópico médio e o valor isotópico mais leve de δ_b , juntamente com o valor isotópico de δ_p , na equação da diluição isotópica (Equação 4 ou 5) para, respectivamente, obter a quantificação máxima, média e mínima da fonte C_3 . Dessa forma foi estabelecida uma faixa de quantificação da fonte C_3 para cada produto comercial.

Mensurado os valores da faixa de quantificação da fonte C_3 para sucos polposos e néctares de maçã comerciais, estes valores foram plotados em gráfico de dispersão relacionando os valores da faixa de quantificação da fonte C_3 com o °Brix das amostras comerciais. Quando toda faixa de quantificação estiver acima do limite de legalidade, este produto foi considerado legal. Caso toda a faixa esteja abaixo deste limite, este produto foi considerado adulterado conforme a legislação brasileira. Quando os valores da faixa de quantificação se sobrepõem aos valores do limite de legalidade, este produto foi classificado como incerto segundo a sua legalidade.

5.3. Análises energéticas em sucos, néctares e refrigerantes de maçã comerciais

A energia calórica dos produtos comerciais foi mensurada de forma direta por bomba calorimétrica, indireta por cálculo centesimal e pela tabela de composição de alimentos e bebidas.

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

Para a caracterização do valor energético através da composição centesimal, foram feitas as seguintes análises:

- **Umidade:** realizada em estufa através da perda de peso da amostra aquecida a $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até peso constante (BRASIL, 2005).
- **Proteína:** realizada mediante a determinação do nitrogênio total, pelo método de Kjeldahl, e conversão em proteína multiplicando o valor obtido pelo fator 6,25 (BRASIL, 2005);
- **Lipídio:** determinado através do método Soxhlet (BRASIL, 2005);

- **Cinzas:** foi realizada a incineração da matéria orgânica e, posteriormente, as amostras foram levadas à mufla a 550°C, para total calcinação, (BRASIL, 2005);
- **Carboidrato:** obtido pela somatória dos resultados das análises de umidade, proteína, lipídio e cinzas subtraído de 100 (BRASIL, 2005).

Após determinação da composição centesimal, cada componente teve seu valor energético calculado através de fatores de conversão: carboidratos 4 kcal g⁻¹; proteínas 4 kcal g⁻¹ e lipídios 9 kcal g⁻¹, (BRASIL, 1999).

Os resultados da bomba calorimétrica e do cálculo estequiométrico foram convertidos para kcal/200mL em função do °Brix e densidade de cada amostra. Esta transformação foi realizada para comparar os resultados obtidos das análises em laboratório com os dados energéticos dos rótulos das amostras. Em seguida, os dados de energia foram convertidos para *Joule* (Sistema Internacional de Medidas), utilizando o fator de 4,1868kJ para 1kcal.

Os resultados da pela bomba calorimétrica e do cálculo centesimal foram comparados com os valores de rótulo e com os valores de tabela de composição de alimentos e bebidas, esta última somente para os sucos.

Foram considerados fora dos padrões de qualidade os valores dos rótulos dos produtos que não estiverem dentro do intervalo de tolerância de $\pm 20\%$ (BRASIL, 2003b).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Matérias-primas

6.1.1. Análises físico-químicas dos sucos concentrados de maçã

A Tabela 9 mostra a concentração de sólidos solúveis dos sucos concentrados clarificados que variou de 70,5 a 73°Brix. Para sucos concentrados polposos, esta variação foi de 40 e 40,8°Brix. Neste caso, os sucos concentrados polposos tiveram menores concentrações de sólidos solúveis que os sucos concentrados clarificados.

O pH variou de 3,19 a 3,83 entre sucos concentrados clarificados e polposos (Tabela 9).

A acidez titulável dos sucos concentrados clarificados variou de 0,45 a 1,17 grama de ácido málico/100 gramas de suco concentrado. Em relação aos sucos concentrados polposos, esta variação foi de 0,63 a 0,68. Portanto, as amostras clarificadas (0,72) apresentam maior variação da acidez que as amostras polposas (0,05) (Tabela 9).

A razão entre o °Brix e acidez titulável (*ratio*), para sucos concentrados clarificados e polposos, variaram entre 60,00 a 155,55. Como a acidez interfere

na mensuração do *ratio*, novamente as amostras do suco concentrado clarificado tiveram as maiores amplitudes nesta variável (Tabela 9).

Tabela 9. Análises físico-químicas dos sucos concentrados.

N°	Suco Concentrado	°Brix	pH	Acidez Titulável ¹	Ratio
17	Clarificado (Refrigerante)	70,30	3,79	0,51	137,84
18	Clarificado (Refrigerante)	70,00	3,83	0,45	155,55
19	Clarificado	70,50	3,52	0,66	106,81
20	Polposo	40,80	3,19	0,68	60,00
34	Clarificado	73,00	3,76	1,17	62,39
36	Polposo	40,00	3,75	0,63	63,49
37	Clarificado	72,00	3,44	0,92	78,26

¹grama de ácido málico/100 gramas de amostra

Como citado anteriormente, a concentração de açúcar presente na maçã pode variar de acordo com diversos fatores intrínsecos (Queiroz, 2005). Conforme a Tabela 10, a participação dos ART na composição dos sólidos solúveis em sucos concentrados de maçã variou de 84,80 a 92,40%.

Tabela 10. Participação da glicose na composição dos sólidos solúveis (°Brix) em sucos concentrados de maçã.

N°	Suco Concentrado	°Brix	g de ART ¹	% de ART ²
17	Clarificado (Refrigerante)	10,00	8,72	87,20
18	Clarificado (Refrigerante)	9,50	8,17	86,00
19	Clarificado	9,90	9,02	91,11
20	Polposo	10,20	8,78	86,08
34	Clarificado	10,00	8,48	84,80
36	Polposo	10,10	8,60	85,15
37	Clarificado	10,00	9,24	92,40

¹gramas de glicose por 100 gramas de amostra

²% de glicose presente na composição do °Brix

6.1.2. Análise isotópica das matérias-primas

Nas amostras de sucos concentrados clarificados e polposos, os valores do enriquecimento isotópico relativo de carbono-13 em relação ao padrão internacional (PDB), variou de -27,66 a -26,87‰. A exceção é a amostra 37 com valor isotópico de -20,07‰. Esta amostra, provavelmente apresenta açúcar de cana em sua composição (Tabela 11).

Quando observamos o açúcar purificado extraído dos sucos concentrados, as variações foram de -27,76 a -26,83‰, novamente excluído a amostra 37, com valor isotópico de -20,01‰. Este dado confirma a presença de açúcar de cana neste produto (Tabela 11). Portanto, a amostra 37 não terá seus valores isotópicos e físico-químicos utilizados neste trabalho. Também foi observada pequena variação entre os valores isotópicos dos sucos concentrados e dos respectivos açúcares purificados. Tal relação também foi relatada por Parker (1982) em um estudo com sucos concentrados. Neste trabalho, os valores do enriquecimento isotópico relativo de carbono do suco e do açúcar purificado foram correlacionados apresentando pequena variação.

Em relação às análises da polpa lavada com água, realizadas nas amostras 20 e 36, estas foram mensuradas em -27,76 e -28,17‰. Nas análises da polpa lavada com acetona, a variação foi de -27,39 e -27,67‰, para as amostras 20 e 36 (Tabela 11). Neste caso, as amostras lavadas com água tiveram maior variação (0,41‰) que as amostras lavadas com acetona (0,28‰). Segundo Rossmann (1997), os sólidos insolúveis (polpa) quando passam por um tratamento com acetona, eliminam carotenóides que interferem na mensuração do valor isotópico. De acordo com estes resultados, o tratamento com acetona, além de contribuir para uma menor variação no valor isotópico da polpa, ainda torna estes valores mais pesados em relação ao enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água.

Tabela 11. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos concentrados e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído dos sucos concentrados.

Nº	Suco Concentrado	Bebida ($\delta\text{‰}$)	D.M. ¹	Polpa Água ($\delta\text{‰}$)	D.M.	Polpa Acetona ($\delta\text{‰}$)	D.M.	Açúcar Purificado ($\delta\text{‰}$)	D.M.
17	Clarificado (Refrigerante)	-27,33	0,02	*	-	*	-	-27,41	0,01
18	Clarificado (Refrigerante)	-27,39	0,04	*	-	*	-	-27,76	0,01
19	Clarificado	-27,66	0,01	*	-	*	-	-27,72	0,01
20	Polposo	-27,56	0,03	-27,76	0,06	-27,39	0,02	-27,56	0,03
34	Clarificado	-27,24	0,02	-	-	-	-	-27,24	0,02
36	Polposo	-26,87	0,04	-28,17	0,07	-27,67	0,04	-26,83	0,03
37	Clarificado	-20,07	0,04	*	-	*	-	-20,01	0,01

¹desvio-médio

*isento de polpa

Na Tabela 12, estão representados alguns açúcares utilizados pelas indústrias de sucos, néctares e refrigerantes de maçã. Nessas amostras, foram observadas pequenas variações do enriquecimento isotópico relativo, com valor isotópico médio de $-12,72 \pm 0,16\text{‰}$.

Tabela 12. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 nas amostras de açúcares de cana.

Nº	Açúcares	Média ($\delta\text{‰}$)	D.M. ¹
38	Cristal	-12,63	0,01
38.1	Cristal	-12,92	0,07
38.2	Cristal	-12,71	0,04
38.3	Cristal	-12,69	0,08
38.4	Cristal	-12,89	0,08
38.5	Cristal	-12,56	0,04
38.6	Refinado	-12,62	0,02
38.7	Refinado	-12,98	0,13
38.8	Refinado	-12,78	0,01
38.9	Líquido	-12,69	0,03
38.10	Líquido	-12,56	0,01
38.11	Líquido	-12,88	0,02
38.12	Líquido	-12,54	0,15
38.13	Líquido	-13,06	0,11
38.14	Invertido	-12,51	0,07
38.15	Invertido	-12,69	0,01
38.16	Invertido	-12,79	0,01
38.17	Xarope de Caramelo	-12,51	0,06
38.18	Glacê	-12,84	0,05
38.19	Demerara	-12,56	0,04
Média		-12,72	
Desvio-padrão		0,16	

¹desvio-médio

Os enriquecimentos isotópicos do ^{13}C dos aditivos utilizados na produção de sucos, néctares e refrigerantes de maçã, estão representados na Tabela 13. Alguns aditivos como aroma de maçã, goma xantana e benzoato de sódio, apresentam valor isotópico próximo do encontrado para suco concentrado de maçã (Fonte C₃). Já o ácido ascórbico, ácido cítrico e o corante de caramelo, possuem valor isotópico semelhante ao mensurado para açúcar de cana (Fonte C₄).

Tabela 13. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 dos aditivos utilizados na produção de sucos, néctares e refrigerantes de maçã.

Nº	Aditivos	Média ($\delta\text{‰}$)	D.M. ¹
111	Aroma de Maçã	-30,26	0,06
112	Ácido Ascórbico	-13,91	0,17
113	Goma Xantana	-26,07	0,03
114	Benzoato de Sódio	-30,29	0,06
115	Pectina	-20,22	0,18
116	Ácido Cítrico	-10,99	0,04
117	Corante de Caramelo	-11,82	0,01

¹desvio-médio

6.2. Suco Clarificado de Maçã

6.2.1. Produção em laboratório dos sucos clarificados de maçã

Com o suco de maçã concentrado clarificado (amostra 19), açúcar de cana (amostra 38) e água foram produzidos, em laboratório, sucos de maçã com concentração de sólidos solúveis inicial em 10,5°Brix. Em seguida foram adicionados quantidades crescentes de açúcar de cana nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0% (M/M) (Tabela 14).

Tabela 14. Balanço de massa para sucos clarificados de maçã adicionados com 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0% de açúcar de cana (M/M).

Nº	% Açúcar ¹	°Brix Inicial Suco ²	g ³ Suco	°Brix Açúcar	g Açúcar	g Suco Adoçado	°Brix Suco Adoçado
50	0,00	10,50	250,00	100,00	0,00	250,00	10,50
51	2,50	10,50	250,00	100,00	6,25	256,25	12,68
52	5,00	10,50	250,00	100,00	12,50	262,50	14,76
53	7,50	10,50	250,00	100,00	18,75	268,75	16,74
54	10,00	10,50	250,00	100,00	25,00	275,00	18,64
55	12,50	10,50	250,00	100,00	31,25	281,25	20,44
56	15,00	10,50	250,00	100,00	37,50	287,50	22,17
57	17,50	10,50	250,00	100,00	43,75	293,75	23,83
58	20,00	10,50	250,00	100,00	50,00	300,00	25,42

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²suco concentrado (amostra 19)

³gramas

6.2.2. Análises físico-químicas dos sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório

A concentração de sólidos solúveis para sucos clarificados apresentou variação crescente de 10,5 a 26,0°Brix devido a adição de açúcar de cana nas quantidades de 0 a 20% (Tabela 15).

As análises feitas de pH (3,67 a 3,80) sugerem que a adição de açúcar não interferiu na mensuração deste parâmetro (Tabela 15).

A acidez titulável medida nos sucos clarificados variou de 0,14 a 0,16 grama de ácido málico/100 gramas de suco. A mensuração desta variável também não apresentou relação com as adições crescentes de açúcar de cana (Tabela 15).

A razão °Brix/acidez teve valores crescentes de 65,62 a 173,33 devido ao acréscimo de açúcar de cana que interfere na mensuração do °Brix (Tabela 15).

Tabela 15. Análises físico-químicas dos sucos clarificados fabricados em laboratório.

Nº	Suco	% Açúcar ¹	°Brix	pH	Acidez Titulável ²	Ratio
50	Clarificado	0,00	10,50	3,76	0,16	65,62
51	Clarificado	2,50	12,70	3,67	0,16	79,37
52	Clarificado	5,00	14,80	3,77	0,15	98,67
53	Clarificado	7,50	16,80	3,71	0,15	112,00
54	Clarificado	10,00	18,70	3,77	0,14	133,57
55	Clarificado	12,50	20,50	3,72	0,14	146,42
56	Clarificado	15,00	22,30	3,72	0,15	148,67
57	Clarificado	17,50	24,50	3,80	0,15	163,33
58	Clarificado	20,00	26,00	3,79	0,15	173,33

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²gramas de ácido málico/100gramas de amostra

6.2.3. Análises físico-químicas dos sucos clarificados de maçã comerciais

A concentração de sólidos solúveis nas amostras 30 e 31 foi de 11,6 e 11,4°Brix, respectivamente (Tabela 16). Estes dados estão em acordo com as normas do MAPA que estabelece valores mínimos de sólidos solúveis em 10,5°Brix (BRASIL, 1997).

As análises feitas de pH variaram de 3,09 e 3,56 (Tabela 16). Comparando com os resultados dos sucos clarificados fabricados em laboratório (Tabela 15), estes tiveram valores de pH superiores que os mensurados para os sucos clarificados de maçã comerciais.

A acidez titulável medida em sucos comerciais clarificados foi de 0,15 e 0,21 grama de ácido málico/100 gramas de suco (Tabela 16). Da mesma forma ocorrida para a concentração de sólidos solúveis, a variável acidez está de acordo com as normas do MAPA que estabelece valores mínimos de 0,15 grama de ácido málico/100 gramas de suco (BRASIL, 1997).

A razão °Brix/acidez das amostras 30 e 31 foi de 77,33 e 54,28, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16. Análises físico-químicas dos sucos comerciais clarificados.

Nº	Suco Clarificado	°Brix	pH	Acidez Titulável ¹	Ratio
30	Adoçado	11,60	3,56	0,15	77,33
31	Adoçado	11,40	3,09	0,21	54,28

¹gramas de ácido málico/100gramas de amostra

6.2.4. Quantificação teórica de fonte C₃ em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório

A partir dos dados da Tabela 14, foi possível calcular, utilizando a Equação 6 (°Brix), a quantidade teórica de fonte C₃ (% sólidos solúveis) nas amostras de suco clarificado de maçã fabricados em laboratório (Tabela 17). Estes valores teóricos serão utilizados para verificar a acuidade da mensuração de fonte C₃, calculada de forma prática, em suco clarificado de maçã fabricados em laboratório.

Tabela 17. Porcentagem de sólidos solúveis procedentes de fonte C₃, calculada de forma teórica, em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório.

Nº	% Açúcar ¹	Massa de Sólidos Solúveis do Suco(g)	Massa de Sólidos Solúveis do Açúcar(g)	Massa de Sólidos Solúveis Totais (g)	% Teórica de Sólidos Solúveis Suco (Fonte C ₃)
50	0,00	26,25	0,00	26,25	100,00
51	2,50	26,25	6,25	32,50	80,77
52	5,00	26,25	12,50	38,75	67,74
53	7,50	26,25	18,75	45,00	58,33
54	10,00	26,25	25,00	51,25	51,22
55	12,50	26,25	31,25	57,50	45,65
56	15,00	26,25	37,50	63,75	41,18
57	17,50	26,25	43,75	70,00	37,50
58	20,00	26,25	50,00	76,25	34,43

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

6.2.5. Análise isotópica dos sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório

O suco clarificado fabricado em laboratório, teve variação crescente de -27,78 a -17,81‰ (Tabela 18). Para o açúcar purificado extraído do suco, estes valores também foram crescentes, com variação isotópica de -27,78 a -18,07‰. Este padrão observado deve-se ao acréscimo de açúcar de cana (Amostra 38: -12,63‰) à bebida, deixando a amostra mais enriquecida de fonte C₄.

Tabela 18. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos clarificados fabricados em laboratório e na fração do açúcar purificado extraídos destes sucos.

Nº	% Açúcar ¹	Suco Clarificado de Laboratório (δ‰)	D.M. ²	Açúcar Purificado (δ‰)	D.M.
50	0,00	-27,78	0,01	-27,78	0,01
51	2,50	-24,79	0,01	-24,75	0,02
52	5,00	-22,72	0,02	-22,49	0,01
53	7,50	-21,43	0,01	-21,23	0,01
54	10,00	-20,32	0,01	-20,30	0,01
55	12,50	-19,53	0,03	-19,46	0,01
56	15,00	-18,82	0,01	-18,78	0,03
57	17,50	-18,25	0,05	-18,60	0,04
58	20,00	-17,81	0,01	-18,07	0,01

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²desvio-médio

6.2.6. Definição dos melhores parâmetros de δ_a, δ_b e δ_p para quantificar a participação de fonte C₃ em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório

Na fabricação dos sucos clarificados foram utilizados, como matérias-primas, suco concentrado clarificado (amostra 19), açúcar cristal (amostra 38) e água. Conhecendo-se o enriquecimento isotópico relativo do suco clarificado fabricado em laboratório, do açúcar purificado extraído destes sucos e das matérias-primas empregadas na sua fabricação, foi possível, utilizando a equação da diluição isotópica (Equação 4), determinar a participação do suco concentrado clarificado (Fonte C₃).

- **Suco concentrado (δa) vs. Suco fabricado em laboratório (δp)**

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado (amostra 19 – Tabela 11) em δa , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o suco clarificado fabricados em laboratório (Tabela 18) em δp , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã ($\%C_3$). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 17) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 19).

Tabela 19. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 (mensurados no espectrômetro de massa), utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado em δa , açúcar cristal em δb e o suco clarificado fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Açúcar ¹	% C_3 Teórico	% C_3 Prático	Erro (%) ²
50	0,00	100,00	100,80	0,80
51	2,50	80,77	80,90	0,13
52	5,00	67,74	67,13	0,61
53	7,50	58,33	58,55	0,22
54	10,00	51,22	51,16	0,06
55	12,50	45,65	45,87	0,22
56	15,00	41,18	41,18	0,00
57	17,50	37,50	37,39	0,11
58	20,00	34,43	34,46	0,03

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²% C_3 teórico - % C_3 prático

- **Suco concentrado (δa) vs. Açúcar purificado extraído do suco fabricado em laboratório (δp)**

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado (amostra 19 – Tabela 11) em δa , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o açúcar purificado extraído dos sucos clarificados fabricados em laboratório (Tabela 18) em δp , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã ($\%C_3$). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 17) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 20).

Tabela 20. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado em δa , açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraído dos sucos clarificados fabricados em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
50	0,00	100,00	100,80	0,80
51	2,50	80,77	80,63	0,14
52	5,00	67,74	65,60	2,14
53	7,50	58,33	57,19	1,14
54	10,00	51,22	51,03	0,19
55	12,50	45,65	45,41	0,24
56	15,00	41,18	40,92	0,26
57	17,50	37,50	39,69	2,19
58	20,00	34,43	36,19	1,76

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

- **Açúcar purificado extraído do suco concentrado (δa) vs. Suco fabricado em laboratório (δp)**

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (amostra 19 – Tabela 11) em δa , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o suco clarificado fabricado em laboratório (Tabela 18) em δp , obteve-se a quantificação prática da matérias-prima de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 17) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 21).

Tabela 21. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado em δa , açúcar cristal em δb e o suco clarificado fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
50	0,00	100,00	100,40	0,40
51	2,50	80,77	80,91	0,14
52	5,00	67,74	66,87	0,87
53	7,50	58,33	58,32	0,01
54	10,00	51,22	50,96	0,26
55	12,50	45,65	45,69	0,04
56	15,00	41,18	41,02	0,16
57	17,50	37,50	37,24	0,26
58	20,00	34,43	34,33	0,10

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

- **Açúcar purificado extraído do suco concentrado (δa) vs. Açúcar purificado extraído suco fabricado em laboratório (δp)**

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (amostra 19 – Tabela 11) em δa , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o açúcar purificado extraído do suco clarificado fabricado em laboratório (Tabela 18) em δp , obteve-se a quantificação prática da matérias-prima de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 17) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 22).

Tabela 22. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado em δa , açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraído do suco clarificado fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
50	0,0	100,00	100,40	0,40
51	2,5	80,77	80,32	0,45
52	5,0	67,74	65,34	2,40
53	7,5	58,33	56,96	1,37
54	10,0	51,22	50,83	0,39
55	12,5	45,65	45,23	0,42
56	15,0	41,18	40,76	0,42
57	17,5	37,50	39,53	2,03
58	20,0	34,43	36,05	1,62

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

6.2.7. Identificação da combinação mais precisa para a mensuração de fonte C₃ em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório

Comparando a quantificação teórica (balanço de sólidos solúveis) e a quantificação prática de C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) foi verificado que, quando combinamos o suco concentrado clarificado (δa) vs. suco clarificado fabricado em laboratório (δp), obtemos resultados mais exatos nas amostras 51, 52, 54, 56, 57 e 58. Quando combinamos o açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δa) vs. suco clarificado fabricado em laboratório (δp), os resultados mais exatos foram das amostras 50, 53 e 55. Na combinação do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δa) vs. açúcar purificado extraído do suco clarificado fabricado em laboratório (δp), somente a amostra 50 obteve resultado mais exato (Tabela 23).

Quando a comparação entre as combinações é realizada com base na somatória dos erros, a melhor combinação foi a do suco concentrado clarificado em δa e o suco clarificado fabricados em laboratório em δp (Tabela 23).

Observando os resultados mais exatos e a somatória dos erros de cada combinação, conclui-se que utilizando o suco concentrado clarificado (δa) vs. suco clarificado fabricados em laboratório (δp) obtem-se os melhores resultados para a quantificação de C_3 em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório. Esta combinação foi utilizada como padrão para todos os cálculos em sucos clarificados de maçã.

Tabela 23. Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C_3 e estimativa de erro nas combinações realizadas de δa e δp em suco clarificado de maçã fabricado em laboratório.

Nº	% Açúcar ¹	% C_3 Teórico	SC x SL	Erro (%) ²	SC x APSL	Erro (%)	APSC x SL	Erro (%)	APSC x APSL	Erro (%)
50	0,00	100,00	100,80	0,80	100,80	0,80	100,40	0,40	100,40	0,40
51	2,50	80,77	80,90	0,13	80,63	0,14	80,91	0,14	80,32	0,45
52	5,00	67,74	67,13	0,61	65,60	2,14	66,87	0,87	65,34	2,40
53	7,50	58,33	58,55	0,22	57,19	1,14	58,32	0,01	56,96	1,37
54	10,00	51,22	51,16	0,06	51,03	0,19	50,96	0,26	50,83	0,39
55	12,50	45,65	45,87	0,22	45,41	0,24	45,69	0,04	45,23	0,42
56	15,00	41,18	41,18	0,00	40,92	0,26	41,02	0,16	40,76	0,42
57	17,50	37,50	37,39	0,11	39,69	2,19	37,24	0,26	39,53	2,03
58	20,00	34,43	34,46	0,03	36,19	1,76	34,33	0,10	36,05	1,62
Somatória dos Erros (%)				2,18		8,86		2,24		9,50

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²% C_3 teórico - % C_3 prático

negrito = resultados mais exatos em relação a % teórica de fonte C_3

SC x SL - suco concentrado clarificado (δa) vs. suco clarificado fabricados em laboratório (δp)

SC x APSL - suco concentrado clarificado (δa) vs. açúcar purificado extraído do suco fabricado em laboratório (δp)

APSC x SL - açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δa) vs. suco clarificado fabricados em laboratório (δp)

APSC x APSL - açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δa) vs. açúcar purificado extraído do suco fabricado em laboratório (δp)

6.2.8. Comparação da mensuração de fonte C_3 entre sucos clarificados de maçã fabricados sem aditivos e sucos clarificados fabricados com aditivos

Com a finalidade de verificar se os aditivos utilizados na produção dos sucos clarificados de maçã causam diferenças significativas na mensuração de fonte C_3 , foram fabricados produtos com aditivos e comparados estatisticamente com sucos clarificados produzidos sem aditivos.

A comparação estatística foi realizada entre sucos fabricados com a mesma porcentagem de açúcar adicionado. Utilizando o Teste t para amostras pareadas ($\alpha < 0,05$), não foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras de suco clarificado fabricado em laboratório (Tabela 24).

Tabela 24. Comparação da mensuração de fonte C_3 entre sucos clarificados fabricados sem aditivos e sucos clarificados fabricados com aditivos.

Nº	% Açúcar ¹	% C_3 Teórica	Suco Clarificado	% C_3 Prática ³	Erro (%) ²
133	0,00	100,00	Sem aditivos	99,91 a	0,60
133.1	0,00	100,00	Com aditivos	100,51 a	
134	5,00	67,74	Sem aditivos	67,76 b	0,20
134.1	5,00	67,74	Com aditivos	67,56 b	
135	10,00	51,22	Sem aditivos	50,96 c	0,33
135.1	10,00	51,22	Com aditivos	51,29 c	
136	15,00	41,18	Sem aditivos	41,65 d	0,47
136.1	15,00	41,18	Com aditivos	41,18 d	
137	20,00	34,43	Sem aditivos	34,13 e	0,20
137.1	20,00	34,43	Com aditivos	34,33 e	

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²% C_3 sem aditivo - % C_3 com aditivo

³letras em comum não diferem estatisticamente (Teste t para amostras pareadas, $\alpha < 0,05$)

6.2.9. Definição da equação mais precisa para a mensuração da fonte C_3 em sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório

A participação de fonte C_3 , em sucos clarificados de maçã, pode ser quantificada utilizando duas equações: a Equação 4 (diluição isotópica simples) e a Equação 5 (diluição isotópica com fatores de correção). Na Equação 5, foi adotado o fator de correção máximo ($A=0,91$) e o fator de correção mínimo ($A=0,84$) com base na participação dos açúcares da maçã na composição dos sólidos solúveis dos sucos concentrados (Tabela 10).

Para quantificar a participação de fonte C_3 em sucos clarificados de maçã, foi adotado a média do valor isotópico para a fonte C_3 (suco concentrado de maçã - δa), a média do valor isotópico para a fonte C_4 (açúcar de cana - δb) e o valor isotópico dos sucos

fabricados em laboratório para δp . Neste caso, foi utilizado o valor isotópico médio de $-27,45\text{‰}$ (média entre as amostras 19 e 34 - Tabela 11) como padrão fixo de suco concentrado clarificado de maçã (δa), $-12,72\text{‰}$ (Tabela 12) para açúcar de cana (δb) e os valores isotópicos dos sucos fabricados em laboratório (δp) representados na Tabela 18.

De acordo com a Tabela 25, a participação de fonte C_3 em sucos clarificados de maçã, calculada pela Equação 4, obteve melhores resultados nas amostras 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58. Quando esta mensuração foi estimada pela Equação 5 ($A=0,84$), somente a amostra 50 teve resultado satisfatório.

A comparação das equações também foi feita pela somatória dos erros. Dessa forma, novamente a melhor equação foi a 4 (diluição isotópica simples) (Tabela 25).

Tabela 25. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C_3 calculados por meio das equações 4 e 5 em suco clarificado de maçã.

N°	Equação 4				Equação 5			
	% Açúcar ¹	% C_3 Teórico	% C_3	Erro (%) ²	% C_3 (0,91) ³	Erro (%)	% C_3 (0,84) ³	Erro (%)
50	0,00	100,00	102,24	2,24	102,03	2,03	101,88	1,88
51	2,50	80,77	81,94	1,17	83,30	2,53	84,38	3,61
52	5,00	67,74	67,89	0,15	69,91	2,17	71,57	3,83
53	7,50	58,33	59,13	0,80	61,39	3,06	63,27	4,94
54	10,00	51,22	51,60	0,38	53,95	2,73	55,93	4,71
55	12,50	45,65	46,20	0,55	48,55	2,90	50,55	4,90
56	15,00	41,18	41,41	0,24	43,72	2,54	45,70	4,52
57	17,50	37,50	37,54	0,04	39,78	2,28	41,71	4,21
58	20,00	34,43	34,56	0,13	36,72	2,29	38,60	4,17
Somatória dos Erros				5,70		22,53		36,77

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²1% C_3 teórico - % C_3 prático

³fator de correção (A) mensurado com base na participação dos açúcares da maçã na composição do °Brix

negrito = resultados mais exatos em relação a % teórica de fonte C_3

A Equação 4 obteve resultados mais exatos para sucos clarificados de maçã fabricados em laboratório. Portanto, esta equação foi a utilizada para calcular a participação de fonte C_3 nas amostras de suco clarificado de maçã comerciais.

6.2.10. Concepção do limite de legalidade para sucos clarificados de maçã

Para determinar a legalidade de um suco clarificado comercial, será necessário a criação do limite de legalidade. O limite de legalidade fornece a concentração mínima de C_3 que um suco clarificado de maçã deve apresentar para ser considerado legal, diante a legislação brasileira. Este cálculo foi empregado em sucos clarificados de maçã com concentrações de sólidos solúveis iniciais em 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5; 13,0; 13,5 e 14,0°Brix adicionados de 10% de açúcar (quantidade máxima de açúcar permitida pela legislação brasileira) em relação à massa de suco (Tabela 26).

Tabela 26. Balanço de massa para sucos clarificados de maçã adicionados com 10% de açúcar de cana (M/M).

Nº	°Brix Inicial do Suco	g ¹ Suco	°Brix Açúcar	% Açúcar Adicionado	g Açúcar Adicionado	g Suco Adoçado	°Brix Suco Adoçado
140	10,50	250,00	100,00	10,00	25,00	275,00	18,64
141	11,00	250,00	100,00	10,00	25,00	275,00	19,09
142	11,50	250,00	100,00	10,00	25,00	275,00	19,55
143	12,00	250,00	100,00	10,00	25,00	275,00	20,00
144	12,50	250,00	100,00	10,00	25,00	275,00	20,45
145	13,00	250,00	100,00	10,00	25,00	275,00	20,91
146	13,50	250,00	100,00	10,00	25,00	275,00	21,36
147	14,00	250,00	100,00	10,00	25,00	275,00	21,82

¹gramas

A partir dos dados da Tabela 26, foi possível calcular, utilizando a Equação 6 (°Brix), a porcentagem mínima de sólidos solúveis dos sucos (fonte C_3), após a adição de 10% de açúcar de cana (M/M) nas amostra de suco clarificado (Tabela 27).

Tabela 27. Porcentagem mínima de sólidos solúveis procedentes de fonte C₃ em sucos clarificados de maçã com adição de 10% de açúcar de cana (M/M).

Nº	°Brix Inicial do Suco	Massa de Sólidos Solúveis do Suco(g)	Massa de Sólidos Solúveis do Açúcar(g)	Massa de Sólidos Solúveis Totais (g)	%Sólidos Solúveis Suco (Fonte C ₃) Limite de Legalidade
140	10,50	26,25	25,00	51,25	51,22
141	11,00	27,50	25,00	52,50	52,38
142	11,50	28,75	25,00	53,75	53,49
143	12,00	30,00	25,00	55,00	54,55
144	12,50	31,25	25,00	56,25	55,56
145	13,00	32,50	25,00	57,50	56,52
146	13,50	33,75	25,00	58,75	57,45
147	14,00	35,00	25,00	60,00	58,33

Na Tabela 27 estão representados os valores do limite de legalidade em relação ao °Brix de cada amostra. Estes valores foram utilizados para verificar a legalidade de sucos clarificados de maçã comercial que apresentam açúcar de cana em sua composição. Caso o suco clarificado de maçã comercial seja denominado “integral”, este produto, necessariamente, não poderá conter açúcar de cana. Neste caso, a quantificação de fonte C₃ será sempre de 100% independentemente do °Brix da amostra.

Os valores da quantificação de fonte C₃ acima do limite de legalidade foram considerados legais. Caso estes valores estejam abaixo desta curva, estes produtos foram considerados adulterados conforme as normas da legislação brasileira para suco clarificado de maçã comercial.

6.2.11. Análise isotópica e determinação da legalidade dos sucos clarificados de maçã comerciais

De acordo com a Tabela 28, a variação no enriquecimento isotópico relativo foi de -20,90 a -15,69‰ nos sucos clarificados comerciais, e -20,41 a -15,90‰ para os açúcares purificados dos sucos comerciais.

Tabela 28. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos clarificados comerciais e na fração do açúcar purificado extraído destes sucos.

N°	Suco Clarificado	Suco Comercial ($\delta\text{‰}$)	D.M. ¹	Açúcar Purificado ($\delta\text{‰}$)	D.M.
30	Adoçado	-20,90	0,02	-20,41	0,05
31	Adoçado	-15,69	0,01	-15,90	0,04

¹desvio-médio

Para determinar a legalidade em sucos clarificados de maçã comerciais, foram utilizados três valores isotópicos como padrões para δa e δb e o valor isotópico do suco de maçã clarificado comercial em δp . Em δa (suco concentrado clarificado de maçã - Tabela 11) foi empregado o valor isotópico de $-27,66\text{‰}$ (amostra 19) como padrão do valor isotópico mais leve, $-27,24\text{‰}$ (amostra 34) como padrão do valor isotópico mais pesado e $-27,45\text{‰}$ como padrão médio dos valores isotópicos dos sucos concentrados clarificados. Em δb (açúcar de cana – Tabela 12) foi empregado o valor isotópico de $-13,06\text{‰}$ (amostra 38.13) como padrão do valor isotópico mais leve, $-12,51\text{‰}$ (amostra 38.14) como padrão do valor isotópico mais pesado e $-12,72\text{‰}$ como padrão médio das amostras de açúcares. Em δp foram usados os valores isotópicos dos sucos de maçã clarificados comerciais (Tabela 28). O valor isotópico mais leve, o valor isotópico médio e o valor isotópico mais pesado para δa foi combinado, respectivamente, com o valor isotópico mais leve, o valor isotópico médio e o valor isotópico mais pesado para δb conforme as Tabelas 29, 30 e 31.

Tabela 29 - Quantificação de fonte C_3 em sucos clarificados de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico mais leve do suco concentrado clarificado de maçã em δa ($-27,66\text{‰}$), o valor isotópico mais leve do açúcar de cana em δb ($-13,06\text{‰}$) e o valor isotópico do suco de maçã comercial em δp .

N°	°Brix	Suco Concentrado (δa) ($\delta\text{‰}$)	Açúcar de Cana (δb) ($\delta\text{‰}$)	Suco Comercial (δp) ($\delta\text{‰}$)	% C_3
30	11,60	-27,66	-13,06	-20,90	53,70
31	11,40	-27,66	-13,06	-15,69	17,98

Tabela 30 - Quantificação de fonte C₃ em sucos clarificados de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico médio do suco concentrado clarificado de maçã em δa (-27,45‰), o valor isotópico médio do açúcar de cana em δb (-12,72‰) e o valor isotópico do suco de maçã comercial em δp .

Nº	°Brix	Suco Concentrado (δa) (‰)	Açúcar de Cana (δb) (‰)	Suco Comercial (δp) (‰)	% C ₃
30	11,60	-27,45	-12,72	-20,90	55,53
31	11,40	-27,45	-12,72	-15,69	20,13

Tabela 31 - Quantificação de fonte C₃ em sucos clarificados de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico mais pesado do suco concentrado de maçã comercial em δa (-27,24‰), o valor isotópico mais pesado do açúcar de cana em δb (-12,51‰) e o valor isotópico do suco de maçã comercial em δp .

Nº	°Brix	Suco Concentrado (δa) (‰)	Açúcar de Cana (δb) (‰)	Suco Comercial (δp) (‰)	% C ₃
30	11,60	-27,24	-12,51	-20,90	56,96
31	11,40	-27,24	-12,51	-15,69	21,55

De acordo com as Tabelas 29 e 31, as quantidades de fonte C₃ calculada para a amostra 30, variaram de 53,70 a 56,96%. Para a amostra 31 esta variação foi de 17,98 a 21,55% de fonte C₃. Portanto, a diferença entre a quantificação máxima e a mínima de fonte C₃ em sucos clarificados de maçã comerciais não supera 3,57%. Este resultado pode ser considerado satisfatório sabendo que, em sucos clarificados de maçã, não há padrão interno (polpa). Dessa forma, a quantificação de fonte C₃ foi obtida utilizando valores isotópicos para δa e δb a partir das Tabelas 11 e 12 (bancos de dados para suco clarificado de maçã).

Os exemplares de suco clarificado de maçã comercial trazem em suas embalagens a denominação “adoçado”. Dessa forma, estes produtos devem conter, no máximo, 10% (M/M) de adição de açúcar de cana em sua composição, segundo as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2000). Relacionando as quantidades de fonte C₃ ao °Brix dos sucos clarificados comerciais (Figura 1), a amostra 30

esta de acordo com a legislação brasileira. A amostra 31, mesmo trazendo a denominação “adoçado” em sua embalagem, certamente contém mais açúcar de cana do que o estabelecido pelo MAPA. Assim, a amostra 31 foi classificada como adulterada.

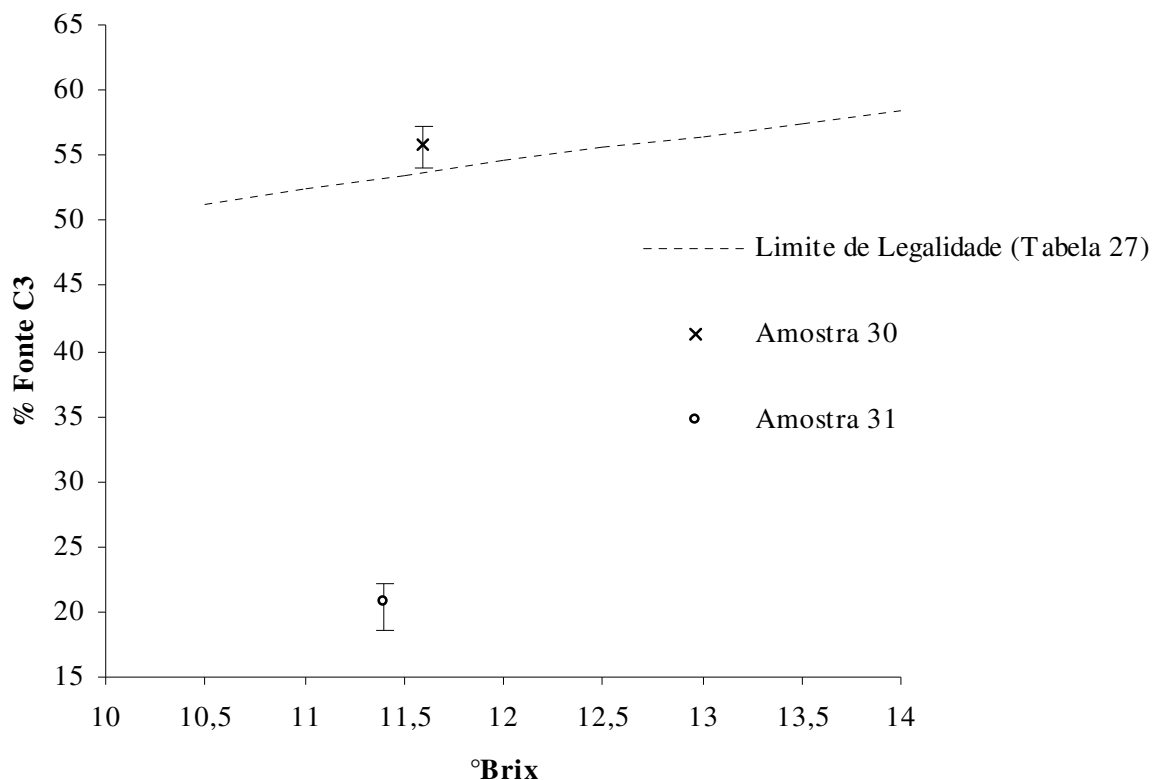


Figura 1. Relação entre a quantidade de fonte C₃ e o °Brix para classificar a legalidade dos sucos clarificados de maçã comerciais.

6.2.12. Análise energética em sucos clarificados de maçã comerciais

A composição centesimal dos sucos clarificados de maçã comerciais esta representada na Tabela 32.

Tabela 32. Composição centesimal de sucos clarificados de maçã comerciais.

Nº	Suco	Carboidrato (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
30	Clarificado	9,95	0,26	0,25	0,15	89,39
31	Clarificado	9,45	0,24	0,64	0,09	89,58

Com base nos dados da Tabela 32 e utilizando os fatores de correção propostos pela ANVISA (BRASIL, 1999), foi mensurado o cálculo centesimal para os sucos clarificados de maçã comerciais (Tabela 33).

Comparando os resultados energéticos da tabela de composição de alimentos (*United States Department of Agriculture / Nacional Agricultural Library – USDA, 2008*) com os resultados do rótulo dos sucos clarificados de maçã comerciais, este último foi sempre superior aos resultados da tabela (Tabela 33). De acordo com Philippi et al. (1995), o valor energético informado no rótulo, geralmente, é obtido em tabelas de composição de alimentos. Porém, na embalagem destes sucos clarificados, não foi encontrado nenhuma informação a respeito do método utilizado para se estimar o valor calórico ou qual tabela de composição de alimentos o valor energético foi consultado. Queiroz (2005) cita que muitos autores condenam a determinação das informações nutricionais através de tabelas de composição de alimento. Segundo Pedrosa et al. (1994), as tabelas não consideram que as matérias-primas podem sofrer variações ao longo do ano o que influencia no cálculo energético. Tannus et al. (2001) sugere que a abordagem mais adequada para se obter o valor energético de alimentos é a calorimetria direta, a qual permite a determinação precisa do conteúdo energético, por meio da combustão completa do alimento.

Comparando o valor energético mensurado pelo cálculo centesimal com o valor energético mensurado pela bomba calorimétrica, este último foi sempre inferior aos resultados do cálculo centesimal. Ambos os métodos (cálculo e bomba) também apresentaram resultados inferiores aos valores energéticos dos rótulos dos sucos clarificados comerciais (Tabela 33).

Conforme determinado pela ANVISA, para suco de maçã são considerados fora dos padrões de qualidade os valores dos rótulos dos produtos que não estiverem dentro do intervalo de tolerância de $\pm 20\%$ (BRASIL, 2003b). Dessa forma, comparando os valores energéticos do cálculo centesimal, bomba calorimétrica e tabela de composição de alimentos com os valores mencionados no rótulo dos sucos comerciais, foi possível concluir que todos os sucos estão de acordo com as normas da ANVISA (Tabela 33).

Tabela 33. Comparação entre o valor energético fornecido no rótulo de sucos clarificados de maçã comerciais e os valores estimados do cálculo centesimal, bomba calorimétrica e pela tabela de composição de alimentos.

N°	Suco	Valores Referentes a 200mL de Suco Clarificado Comercial											
		Rótulo		Limite +20% ¹		Limite -20% ¹		Cálculo		Bomba Calorimétrica		Tabela	
		Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ
30	Clarificado	98,00	409,64	117,60	491,57	78,40	327,71	86,13	326,57	79,45	332,09	86,00	359,48
31	Clarificado	98,00	409,64	117,60	491,57	78,40	327,71	89,01	372,05	79,40	331,89	86,00	359,48

¹Limite de $\pm 20\%$ calculado sobre os valores informados nos rótulos dos produtos comerciais

6.3. Suco Polposo de Maçã

6.3.1. Produção em laboratório de sucos polposos de maçã

Com o suco de maçã concentrado polposo (amostra 20), açúcar de cana (amostra 38) e água foram produzidos, em laboratório, sucos de maçã com concentração de sólidos solúveis inicial em 10,5°Brix. Em seguida foi adicionado quantidades crescentes de açúcar de cana nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0% (M/M) (Tabela 34).

Tabela 34. Balanço de massa para sucos polposos de maçã adicionados com 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 17,5 e 20,0% de açúcar de cana (M/M).

Nº	% Açúcar ¹	°Brix Inicial Suco ²	g ³ Suco	°Brix Açúcar	g Açúcar	g Suco Adoçado	°Brix Suco Adoçado
59	0,00	10,50	250,00	100,00	0,00	250,00	10,50
60	2,50	10,50	250,00	100,00	6,25	256,25	12,68
61	5,00	10,50	250,00	100,00	12,50	262,50	14,76
62	7,50	10,50	250,00	100,00	18,75	268,75	16,74
63	10,00	10,50	250,00	100,00	25,00	275,00	18,64
64	12,50	10,50	250,00	100,00	31,25	281,25	20,44
65	15,00	10,50	250,00	100,00	37,50	287,50	22,17
66	17,50	10,50	250,00	100,00	43,75	293,75	23,83
67	20,00	10,50	250,00	100,00	50,00	300,00	25,42

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²suco concentrado (amostra 20)

³gramas

6.3.2. Análises físico-químicas dos sucos polposos de maçã fabricados em laboratório

A concentração de sólidos solúveis para sucos polposos fabricados em laboratório apresentou variação crescente de 10,5 a 27,2°Brix, devido a adição de açúcar de cana nas quantidades de 0 a 20% (Tabela 35).

As análises feitas de pH (3,39 a 3,52), em sucos polposos sugerem que a adição de açúcar não interferiu na mensuração deste parâmetro como ocorrido para sucos clarificados fabricados em laboratório (Tabela 35).

A acidez medida em sucos polposos variou de 0,17 a 0,20 grama de ácido málico/100 gramas de suco, ou seja, valores superiores aos obtidos em sucos clarificados (Tabela 35).

A razão °Brix/acidez apresentou valores crescentes de 52,5 a 160,0, acompanhando as variações do °Brix (Tabela 35).

Tabela 35. Análises físico-químicas dos sucos polposos fabricados em laboratório.

Nº	Suco	% Açúcar ¹	°Brix	pH	Acidez Titulável ²	Ratio
59	Polposo	0,00	10,50	3,39	0,20	52,50
60	Polposo	2,50	12,60	3,39	0,19	66,30
61	Polposo	5,00	14,70	3,43	0,19	77,37
62	Polposo	7,50	16,70	3,50	0,18	92,70
63	Polposo	10,00	18,70	3,50	0,19	98,42
64	Polposo	12,50	20,00	3,52	0,18	111,11
65	Polposo	15,00	22,10	3,51	0,18	122,78
66	Polposo	17,50	26,90	3,51	0,18	149,44
67	Polposo	20,00	27,20	3,52	0,17	160,00

¹suco concentrado (amostra 20)

²gramas de ácido málico/100gramas de amostra

6.3.3. Análises físico-químicas dos sucos polposos de maçã comerciais

A concentração de sólidos solúveis nas amostras 1, 16 e 28 foi de 11,9, 11,2 e 10,5°Brix, respectivamente (Tabela 36). Estes dados estão em acordo com as normas do MAPA que estabelece valores mínimos de sólidos solúveis em 10,5°Brix (BRASIL, 1997).

As análises feitas de pH (3,54, 3,65 e 3,39) para os sucos polposos comerciais (Tabela 36) apresentam valores similares aos mensurados para os sucos polposos fabricados em laboratório (Tabela 35).

A acidez titulável medida em sucos comerciais polposos variou de 0,25 a 0,37 grama de ácido málico/100 gramas de suco (Tabela 36). Da mesma forma ocorrida para a concentração de sólidos solúveis, a variável acidez está de acordo com as normas do MAPA que estabelece valores mínimos de 0,15 grama de ácido málico/100 gramas de suco (BRASIL, 1997).

A razão °Brix/acidez variou de 32,16 e 42,00 (Tabela 36). Estes valores são inferiores aos observados em suco clarificado de maçã comercial (Tabela 16).

Tabela 36. Análises físico-químicas dos sucos polposos comerciais.

Nº	Suco Polposo	°Brix	pH	Acidez Titulável ¹	Ratio
1	Integral	11,90	3,54	0,37	32,16
16	Integral	11,20	3,65	0,29	38,62
28	Integral	10,50	3,39	0,25	42,00

¹gramas de ácido málico / 100gramas de amostra

6.3.4. Quantificação teórica de fonte C₃ em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório

A partir dos dados da Tabela 34, foi possível calcular, utilizando a Equação 6 (°Brix), a quantidade teórica de fonte C₃ (% sólidos solúveis suco) nas amostra de suco polposos de maçã fabricados em laboratório (Tabela 37). Estes valores teóricos serão utilizados para verificar a acuidade da mensuração de fonte C₃, calculada de forma prática, em suco polposo de maçã fabricados em laboratório.

Tabela 37. Porcentagem de sólidos solúveis procedentes de fonte C₃, calculada de forma teórica, em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório.

Nº	% Açúcar Adicionado ¹	Massa de Sólidos Solúveis do Suco(g)	Massa de Sólidos Solúveis do Açúcar(g)	Massa de Sólidos Solúveis Totais (g)	% Teórica de Sólidos Solúveis Suco (Fonte C ₃)
59	0,00	26,25	0,00	26,25	100,00
60	2,50	26,25	6,25	32,50	80,77
61	5,00	26,25	12,50	38,75	67,74
62	7,50	26,25	18,75	45,00	58,33
63	10,00	26,25	25,00	51,25	51,22
64	12,50	26,25	31,25	57,50	45,65
65	15,00	26,25	37,50	63,75	41,18
66	17,50	26,25	43,75	70,00	37,50
67	20,00	26,25	50,00	76,25	34,43

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

6.3.5. Análise isotópica dos sucos polposos de maçã fabricados em laboratório

De acordo com a Tabela 38, a variação no enriquecimento isotópico relativo foi de -27,62 a -17,87‰ nos sucos polposos, -29,00 a -28,05‰ nas frações da polpa lavada com água, -27,48 a -27,31‰ para polpas lavadas com acetona e -27,53 a -17,72‰ para os açúcares purificados dos sucos polposos.

Nos sucos polposos fabricados em laboratório e nas frações do açúcar purificado extraído destes sucos, a adição de açúcar de cana interfere no valor isotópico tornando as amostras mais enriquecidas em fonte C_4 à medida que a adição de açúcar aumenta. Já para a polpa lavada com água e polpa lavada com acetona, por ser padrões internos, esta variação não ocorre. Esta observação também foi relatada por Kelly (2003) e Jamin et al. (1998), os quais desenvolveram seus trabalhos analisando o padrão interno de sucos, sem quantificar o açúcar utilizado na adulteração.

Tabela 38. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos polposos fabricados em laboratório e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído destes sucos.

Nº	% Aç ¹	Suco Fabricado (δ‰)	D.M. ²	Polpa Água (δ‰)	D.M.	Polpa Acetona (δ‰)	D.M.	Açúcar Purificado (δ‰)	D.M.
59	0,00	-27,62	0,01	-28,52	0,13	-27,48	0,07	-27,53	0,08
60	2,50	-24,53	0,05	-28,64	0,13	-27,35	0,06	-24,54	0,05
61	5,00	-22,70	0,02	-28,26	0,01	-27,31	0,08	-22,59	0,08
62	7,50	-21,49	0,07	-29,00	0,01	-27,45	0,06	-21,30	0,07
63	10,00	-20,35	0,02	-28,36	0,08	-27,46	0,06	-20,31	0,00
64	12,50	-19,36	0,07	-28,47	0,06	-27,36	0,04	-19,33	0,06
65	15,00	-18,80	0,07	-28,05	0,10	-27,31	0,03	-18,72	0,06
66	17,50	-18,22	0,05	-28,60	0,14	-27,31	0,08	-18,17	0,03
67	20,00	-17,87	0,03	-28,39	0,16	-27,47	0,04	-17,72	0,14

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²desvio-médio

6.3.6. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C_3 em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório

Na fabricação dos sucos polposos foram utilizados, como matérias-primas, suco concentrado polposo (amostra 20), açúcar cristal (amostra 38) e água. Conhecendo-se o enriquecimento isotópico relativo do suco polposo fabricado em laboratório, da polpa lavada com água, da polpa lavada com acetona, do açúcar purificado extraído destes sucos e do açúcar de cana empregado na sua fabricação, foi possível, utilizando a equação da diluição isotópica (Equação 4), determinar a participação do suco concentrado polposo (Fonte C_3).

- **Polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório (δa) vs. Suco polposo fabricado em laboratório (δp)**

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório (Tabela 38) em δa , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o suco polposo fabricados em laboratório (Tabela 38) em δp , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã ($\%C_3$). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 37) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 39).

Tabela 39. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o suco polposo fabricados em laboratório em δ_p na equação da diluição isotópica.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
59	0,00	100,00	94,34	5,66
60	2,50	80,77	74,33	6,44
61	5,00	67,74	64,43	3,31
62	7,50	58,33	54,14	4,19
63	10,00	51,22	49,06	2,16
64	12,50	45,65	42,50	3,15
65	15,00	41,18	39,98	1,20
66	17,50	37,50	34,97	2,53
67	20,00	34,43	33,26	1,17

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

- **Polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório (δ_a) vs. Açúcar purificado extraído do suco polposo fabricado em laboratório (δ_p)**

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório (Tabela 38) em δ_a , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δ_b e o açúcar purificado extraídos dos sucos polposos (Tabela 38) em δ_p , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 37) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 40).

Tabela 40. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o açúcar purificado extraídos dos sucos polposos fabricados em laboratório em δ_p na equação da diluição isotópica.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
59	0,00	100,00	93,77	6,23
60	2,50	80,77	74,36	6,41
61	5,00	67,74	63,69	4,05
62	7,50	58,33	52,98	5,35
63	10,00	51,22	48,84	2,38
64	12,50	45,65	42,31	3,34
65	15,00	41,18	39,49	1,69
66	17,50	37,50	34,69	2,81
67	20,00	34,43	32,31	2,12

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²1% C₃ teórico - % C₃ prático

- **Polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório (δ_a) vs. Suco polposo fabricado em laboratório (δ_p)**

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório (Tabela 38) em δ_a , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δ_b e o suco polposo fabricado em laboratório (Tabela 38) em δ_p , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 37) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 41).

Tabela 41. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório em δa, açúcar cristal em δb e o suco polposo fabricados em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
59	0,00	100,00	100,94	0,94
60	2,50	80,77	80,87	0,10
61	5,00	67,74	68,60	0,86
62	7,50	58,33	59,78	1,45
63	10,00	51,22	52,04	0,82
64	12,50	45,65	45,70	0,05
65	15,00	41,18	42,00	0,82
66	17,50	37,50	38,04	0,54
67	20,00	34,43	35,31	0,88

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

- **Polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório (δa) vs. Açúcar purificado extraído do suco polposo fabricado em laboratório (δp)**

Utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório (Tabela 38) em δa, açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o açúcar purificado extraídos dos sucos polposos (Tabela 38) em δp, obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 37) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 42).

Tabela 42. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório em δa, açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraídos dos sucos polposos em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
59	0,00	100,00	100,34	0,34
60	2,50	80,77	80,90	0,13
61	5,00	67,74	67,81	0,07
62	7,50	58,33	58,50	0,17
63	10,00	51,22	51,80	0,58
64	12,50	45,65	45,50	0,15
65	15,00	41,18	41,49	0,31
66	17,50	37,50	37,74	0,24
67	20,00	34,43	34,30	0,13

¹% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

²1% C₃ teórico - % C₃ prático

6.3.7. Identificação da combinação mais precisa para a mensuração da fonte C₃ em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório

Comparando o valor teórico (balanço de sólidos solúveis) e o valor prático de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) foi observado que, quando combinamos a polpa lavada com acetona extraída dos sucos de maçã fabricados em laboratório (δa) vs. açúcar purificado extraído dos sucos polposos fabricados em laboratório (δp), obtemos melhores resultados nas amostras 59, 61, 62, 63, 65, 66 e 67. Utilizando a polpa lavada com acetona extraída dos sucos de maçã fabricados em laboratório (δa) vs. suco polposo fabricados em laboratório (δp), os melhores resultados foram nas amostras 60 e 64 (Tabela 43).

Quando a comparação entre as combinações é realizada com base na somatória dos erros, a melhor combinação foi utilizando a polpa lavada com acetona extraída

dos sucos de maçã fabricados em laboratório em δa e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos fabricados em laboratório em δp (Tabela 43).

Comparando os melhores resultados e a somatória dos erros para cada combinação, conclui-se que a polpa lavada com acetona extraída dos sucos de maçã fabricados em laboratório em δa e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos fabricados em laboratório em δp mensuram com maior precisão a quantificação de fonte C_3 . Esta combinação será utilizada como padrão para todos os cálculos de sucos polposos de maçã.

Tabela 43. Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C_3 e estimativa de erro nas combinações realizadas de δa e δp em suco polposo de maçã fabricado em laboratório.

Nº	% Açúcar ¹	%C ₃ Teórico	PASL x SL	Erro (%) ²	PASL x APSL	Erro (%)	PAcSL x SL	Erro (%)	PAcSL x APSL	Erro (%)
59	0,00	100,00	94,34	5,66	93,77	6,23	100,94	0,94	100,34	0,34
60	2,50	80,77	74,33	6,44	74,36	6,41	80,87	0,10	80,90	0,13
61	5,00	67,74	64,43	3,31	63,69	4,05	68,60	0,86	67,81	0,07
62	7,50	58,33	54,14	4,19	52,98	5,35	59,78	1,45	58,50	0,17
63	10,00	51,22	49,06	2,16	48,84	2,38	52,04	0,82	51,80	0,58
64	12,50	45,65	42,50	3,15	42,31	3,34	45,70	0,05	45,50	0,15
65	15,00	41,18	39,98	1,20	39,49	1,69	42,00	0,82	41,49	0,31
66	17,50	37,50	34,97	2,53	34,69	2,81	38,04	0,54	37,74	0,24
67	20,00	34,43	33,26	1,17	32,31	2,12	35,31	0,88	34,30	0,13
Somatória dos Erros				29,81	34,38		6,46		2,12	

¹% de açúcar (amostra 38) adicionada (M/M)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

negrito = resultados mais exatos em relação a % teórica de fonte C_3

PASL x SL - polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório (δa) vs. suco polposo fabricado em laboratório (δp)

PASL x APSL - polpa lavada com água extraída do suco fabricado em laboratório (δa) vs. açúcar purificado extraído dos sucos polposos fabricados em laboratório (δp)

PAcSL x SL - polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório (δa) vs. suco polposo fabricado em laboratório (δp)

PAcSL x APSL - polpa lavada com acetona extraída do suco fabricado em laboratório (δa) vs. açúcar purificado extraído dos sucos polposos fabricados em laboratório (δp)

6.3.8. Comparação da mensuração de fonte C₃ entre sucos polposos de maçã fabricados sem aditivos e sucos polposos fabricados com aditivos

A comparação estatística foi realizada entre sucos fabricados com a mesma porcentagem de açúcar adicionado. Utilizando o Teste *t* para amostras pareadas ($\alpha < 0,05$), não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados comparados nas porcentagens de 0, 10, 15, 20% de açúcar de cana adicionado (Tabela 44).

Tabela 44. Comparação da mensuração de fonte C₃ entre sucos polposos fabricados sem aditivos e sucos polposos fabricados com aditivos.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórica	Suco Polposo	% C ₃ Prática ³	Erro (%) ²
175	0,00	100,00	Sem aditivos	101,06 a	0,94
175.1	0,00	100,00	Com aditivos	100,12 a	
176	5,00	67,74	Sem aditivos	67,45 b	0,46
176.1	5,00	67,74	Com aditivos	66,99 b	
177	10,00	51,22	Sem aditivos	51,20 d	0,69
177.1	10,00	51,22	Com aditivos	51,89 d	
178	15,00	41,18	Sem aditivos	41,07 e	0,42
178.1	15,00	41,18	Com aditivos	41,49 e	
179	20,00	34,43	Sem aditivos	34,76 f	0,19
179.1	20,00	34,43	Com aditivos	34,57 f	

¹% de açúcar (amostra 38) adicionada (M/M)

²%C₃ sem aditivo - %C₃ com aditivo

³letras em comum não diferem estatisticamente (Teste *t* para amostras pareadas, $\alpha < 0,05$)

6.3.9. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C₃ em sucos polposos de maçã fabricados em laboratório

A participação de fonte C₃, em sucos polposos de maçã, pode ser quantificada utilizando duas equações: Equação 4 (diluição isotópica simples) e Equação 5 (diluição isotópica com fatores de correção). Na Equação 5, foi adotado o fator de correção máximo (A=0,91) e o fator de correção mínimo (A=0,84) com base na participação dos açúcares da maçã na composição dos sólidos solúveis dos sucos concentrados (Tabela 10).

Para quantificar a participação de fonte C₃ em sucos polposos de maçã, foi adotado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos fabricados em laboratório para a fonte C₃ (δa) (Tabela 38), a média do valor isotópico para a fonte C₄ (açúcar de cana - δb) com valor isotópico de -12,72‰ (Tabela 12) e o valor isotópico do açúcar purificado extraído do suco polposo fabricado em laboratório (δp) (Tabela 38).

De acordo com a Tabela 45, a participação de fonte C₃ em sucos polposos de maçã, calculada pela Equação 4, obteve melhores resultados nas amostras 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66 e 67. Quando esta mensuração foi estimada pela Equação 5, com fator de correção de 0,84, somente a amostra 59 teve resultado satisfatório.

A comparação das equações também foi feita pela somatória dos erros. Dessa forma, a equação que teve os resultados práticos de C₃ mais próximos dos resultados teóricos novamente foi a 4 (diluição isotópica simples) (Tabela 45).

Tabela 45. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ calculados por meio das equações 4 e 5 em suco polposo de maçã.

Nº	% Açúcar ¹	% C ₃ Teórico	Equação 4		Equação 5			
			% C ₃	Erro (%) ²	% C ₃ (0,91) ³	Erro (%)	% C ₃ (0,84) ³	Erro (%)
59	0,00	100,00	100,34	0,34	100,31	0,31	100,28	0,28
60	2,50	80,77	80,79	0,02	82,21	1,44	83,35	2,58
61	5,00	67,74	67,61	0,13	69,64	1,90	71,31	3,57
62	7,50	58,33	58,25	0,08	60,52	2,19	62,42	4,08
63	10,00	51,22	51,51	0,29	53,86	2,64	55,84	4,62
64	12,50	45,65	45,17	0,49	47,51	1,86	49,51	3,86
65	15,00	41,18	41,12	0,05	43,43	2,25	45,40	4,22
66	17,50	37,50	37,35	0,15	39,59	2,09	41,52	4,02
67	20,00	34,43	33,90	0,53	36,04	1,62	37,91	3,48
Somatória dos Erros				2,08		16,30		30,71

¹% de açúcar (amostra 38) adicionada (M/M)

² |%C₃ teórico - %C₃ prático|

³ fator de correção (A) mensurado com base na participação dos açúcares da maçã na composição do °Brix

negrito = resultados mais exatos em relação a % teórica de fonte C₃

A Equação 4 obteve resultados mais exatos para sucos polposos de maçã fabricados em laboratório. Portanto, esta equação foi a utilizada para calcular a participação de fonte C_3 nas amostras de sucos polposos de maçã comerciais.

6.3.10. Concepção do limite de legalidade para sucos polposos de maçã

Para determinar a legalidade de um suco polposo comercial, foi necessário a criação do limite de legalidade. O limite de legalidade fornece a concentração mínima de C_3 que um suco polposo de maçã deve apresentar para ser considerado legal, diante a legislação brasileira.

Nos sucos polposos de maçã coletados para este trabalho, todos os produtos trazem em suas embalagens a denominação “integral”. Neste caso, necessariamente, não poderá conter açúcar de cana na composição destes sucos (BRASIL, 1997). Portanto, a quantificação de fonte C_3 será sempre de 100% independentemente do °Brix da amostra (limite de legalidade = 100% de fonte C_3).

6.3.11. Análise isotópica e determinação da legalidade dos sucos polposos de maçã comerciais

De acordo com a Tabela 46, a variação no enriquecimento isotópico relativo foi de -28,14 a -27,36‰ nos sucos polposos comerciais e -28,06 a -27,29‰ para os açúcares purificados extraído destes sucos. Para as frações, polpa lavada com água e polpa lavada com acetona, o enriquecimento isotópico relativo variou, respectivamente, de -31,46 a -28,13‰ e -30,71 a -27,01‰.

Tabela 46. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em sucos polposos comerciais e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído destes sucos.

Nº	Suco Polposo	Suco ($\delta\text{‰}$)	D.M. ¹	Polpa Água ($\delta\text{‰}$)	D.M.	Polpa Acetona ($\delta\text{‰}$)	D.M.	Açúcar Purificado ($\delta\text{‰}$)	D.M.
1	Integral	-27,36	0,02	-28,13	0,01	-27,01	0,04	-27,29	0,01
16	Integral	-27,56	0,04	-30,69	0,10	-27,60	0,02	-27,62	0,01
28	Integral	-28,14	0,01	-31,46	0,03	-30,71	0,01	-28,06	0,03

¹desvio-médio

Para determinar a legalidade em sucos polposos de maçã comerciais, foi utilizado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos comerciais em δa (Tabela 46), três valores como padrões δb e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos comerciais em δp (Tabela 46). Em δb (açúcar de cana – Tabela 12) foi empregado o valor isotópico de $-13,06\text{‰}$ (amostra 38.13) como padrão do valor isotópico mais leve, $-12,51\text{‰}$ (amostra 38.14) como padrão do valor isotópico mais pesado e $-12,72\text{‰}$ como padrão médio das amostras de açúcares. O valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos comerciais em δa foi combinado com o valor isotópico mais leve, o valor isotópico médio e o valor isotópico mais pesado de δb conforme as Tabelas 47, 48 e 49.

Tabela 47. Quantificação de fonte C_3 em sucos polposos de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos de maçã comerciais em δa , o valor isotópico mais leve do açúcar de cana em δb ($-13,06\text{‰}$) e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos comerciais em δp .

Nº	°Brix	Polpa Acetona (δa) ($\delta\text{‰}$)	Açúcar de Cana (δb) ($\delta\text{‰}$)	Açúcar Purificado (δp) ($\delta\text{‰}$)	% C_3
1	11,90	-27,01	-13,06	-27,29	102,04
16	11,20	-27,60	-13,06	-27,62	100,14
28	10,50	-30,71	-13,06	-28,06	85,01

Tabela 48. Quantificação de fonte C₃ em sucos polposos de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos de maçã comerciais em δa , o valor isotópico médio do açúcar de cana em δb (-12,72‰) e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos comerciais em δp .

Nº	°Brix	Polpa Acetona (δa) (‰)	Açúcar de Cana (δb) (‰)	Açúcar Purificado (δp) (‰)	% C ₃
1	11,90	-27,01	-12,72	-27,29	102,00
16	11,20	-27,60	-12,72	-27,62	100,13
28	10,50	-30,71	-12,72	-28,06	85,29

Tabela 49. Quantificação de fonte C₃ em sucos polposos de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos sucos polposos de maçã comerciais em δa , o valor isotópico mais pesado do açúcar de cana em δb (-12,51‰) e o açúcar purificado extraído dos sucos polposos comerciais em δp .

Nº	°Brix	Polpa Acetona (δa) (‰)	Açúcar de Cana (δb) (‰)	Açúcar Purificado (δp) (‰)	% C ₃
1	11,90	-27,01	-12,51	-27,29	101,97
16	11,20	-27,60	-12,51	-27,62	100,13
28	10,50	-30,71	-12,51	-28,06	85,46

De acordo com as Tabelas 47 e 49, a quantidade de fonte C₃ calculada para a amostra 1, variou de 102,04 a 101,97%. Para a amostra 16 a quantificação de fonte C₃ variou de 100,13 a 100,14%. Já para a amostra 28, a participação da fonte C₃ foi de 85,01 a 85,46% de fonte C₃. Portanto, a diferença entre a quantificação máxima e a mínima de fonte C₃ em sucos polposos de maçã comerciais não supera 0,45%. Esta pequena variação ocorreu pela utilização do padrão interno na quantificação da fonte C₃. Além disso, como a concentração de fonte C₃ em sucos polposos se aproxima de 100%, o valor isotópico da fonte C₄ tem pouca influência na quantificação da fonte C₃.

Em todos os casos encontrados, os sucos trazem em suas embalagens a denominação “integral”. De acordo com o Ministério da Agricultura (BRASIL, 1997) é proibida a adição de açúcar de cana nestas bebidas. Assim, a quantificação de fonte C₃ deve ser de 100% independentemente do °Brix das amostras. Com base nestas informações, foi

possível concluir que as amostras 1 e 16 estão de acordo com a legislação brasileira. A amostra 28 certamente contém açúcar de cana em sua composição. Assim, esta amostra foi classificada como adulterada (Figura 2).

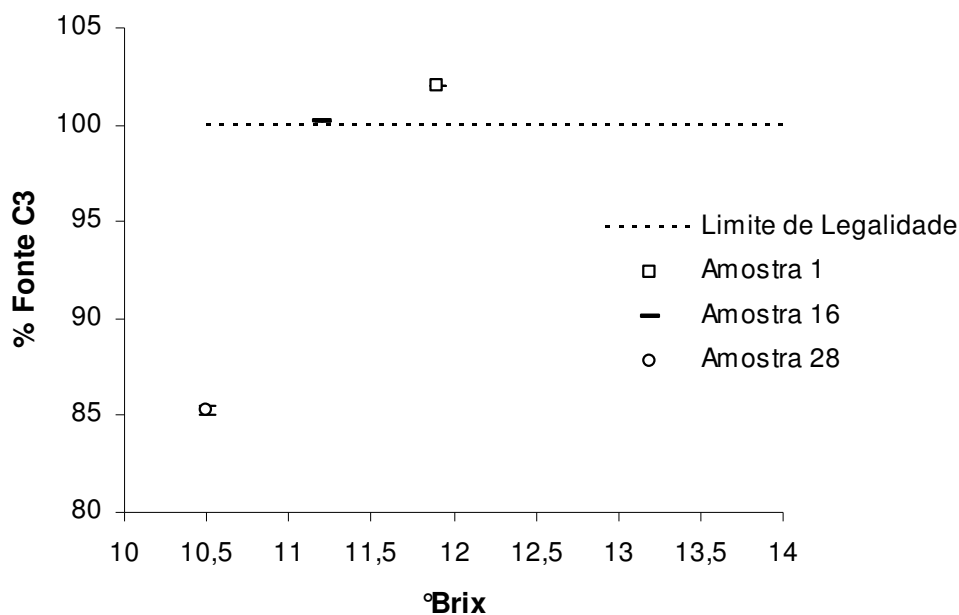


Figura 2. Relação entre a quantidade de fonte C₃ e o °Brix para classificar a legalidade dos sucos polposos de maçã comerciais.

6.3.12. Análises energéticas em sucos polposos de maçã comerciais

A composição centesimal dos sucos clarificados de maçã comerciais esta representada na Tabela 50.

Tabela 50. Composição centesimal de sucos polposos de maçã comerciais.

Nº	Suco	Carboidrato (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
1	Polposo	9,06	0,47	0,11	0,27	90,09
16	Polposo	7,36	0,43	0,24	0,66	91,31
28	Polposo	11,43	0,26	0,56	0,14	87,61

Com base nos dados da Tabela 50 e utilizando os fatores de correção propostos pela ANVISA (BRASIL, 1999), foi mensurado o cálculo centesimal para os sucos polposos de maçã comerciais (Tabela 51).

Comparando os resultados energéticos da tabela de composição de alimentos (*United States Department of Agriculture / Nacional Agricultural Library – USDA, 2008*) com os resultados do rótulo dos sucos polposos de maçã comerciais, este último teve resultado inferior na amostra 16 e superior nas amostras 1 e 28 (Tabela 51). Novamente na embalagem destes sucos, não foi encontrado nenhuma informação a respeito do método utilizado para se estimar o valor calórico ou de qual tabela de composição de alimentos o valor energético foi consultado.

Quando o valor energético informado no rótulo dos sucos polposos comerciais foi comparado com o valor energético mensurado pelo cálculo centesimal e bomba calorimétrica, ambos os métodos (cálculo e bomba) apresentaram resultados inferiores aos valores energéticos dos rótulos (Tabela 51). Esta observação também foi relatada para suco clarificado de maçã comercial (Tabela 33).

Conforme determinado pela ANVISA, para suco de maçã são considerados fora dos padrões de qualidade os valores dos rótulos dos produtos que extrapolarem o intervalo de tolerância de $\pm 20\%$ (BRASIL, 2003b). Comparando os valores energéticos do cálculo centesimal com os valores mencionados no rótulo dos sucos comerciais, foi possível concluir que todas as amostras estão dentro do intervalo de tolerância determinado pela ANVISA. Quando esta comparação é feita com os valores energéticos mensurados pela bomba calorimétrica e tabela de composição de alimentos as amostras 1 e 16 estão de acordo com a legislação brasileira. Na amostra 28, os valores energéticos obtidos pela bomba calorimétrica e tabela de composição de alimentos tiveram resultados inferiores ao limite de -20% . Dessa forma, a amostra 28 está fora do intervalo determinado pela ANVISA (Tabela 51).

Tabela 51. Comparação entre o valor energético fornecido no rótulo de sucos polposos de maçã comerciais e os valores estimados do cálculo centesimal, bomba calorimétrica e tabela de composição de alimentos.

Valores Referentes a 200mL de Suco Polposo Comercial													
N°	Suco	Rótulo		Limite +20% ¹		Limite -20% ¹		Cálculo		Bomba Calorimétrica		Tabela	
		Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ
1	Polposo	90,00	376,20	108,00	451,44	72,00	300,96	78,23	327,01	78,58	328,45	86,00	359,48
16	Polposo	80,00	334,40	96,00	401,28	64,00	267,52	66,61	278,42	78,57	328,43	86,00	359,48
28	Polposo	129,00	539,22	154,80	647,06	103,20	431,38	103,58	432,97	79,97	334,26	86,00	359,48

¹Limite de $\pm 20\%$ calculado sobre os valores informados nos rótulos dos produtos comerciais

6.4. Néctar de Maçã

6.4.1. Produção em laboratório de néctar de maçã

A partir do suco de maçã concentrado polposo (amostra 36), água e açúcar de cana (amostra 38) foram produzidos, em laboratório, néctares de maçã com concentração de sólidos solúveis final em 12°Brix (menor valor encontrado nos produtos comerciais). Estes produtos foram fabricados com 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80% (M/M) de suco polposo a 10,5°Brix (Tabela 52).

Tabela 52. Balanço de massa para néctares de maçã produzidos com 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80% (M/M) de suco polposo a 10,5°Brix.

Nº	% Suco ¹	°Brix Suco	g ² Suco	°Brix Açúcar	g Açúcar ³	°Brix Água	g Água	°Brix Néctar	g Néctar
80	0,00	10,50	0,00	100,00	30,00	0,00	220,00	12,00	250,00
81	5,00	10,50	12,50	100,00	28,69	0,00	208,81	12,00	250,00
82	10,00	10,50	25,00	100,00	27,38	0,00	197,63	12,00	250,00
83	15,00	10,50	37,50	100,00	26,06	0,00	186,44	12,00	250,00
84	20,00	10,50	50,00	100,00	24,75	0,00	175,25	12,00	250,00
85	25,00	10,50	62,50	100,00	23,44	0,00	164,06	12,00	250,00
86	30,00	10,50	75,00	100,00	22,13	0,00	152,88	12,00	250,00
87	35,00	10,50	87,50	100,00	20,81	0,00	141,69	12,00	250,00
88	40,00	10,50	100,00	100,00	19,50	0,00	130,50	12,00	250,00
89	45,00	10,50	112,50	100,00	18,19	0,00	119,31	12,00	250,00
90	50,00	10,50	125,00	100,00	16,88	0,00	108,13	12,00	250,00
91	55,00	10,50	137,50	100,00	15,56	0,00	96,94	12,00	250,00
92	60,00	10,50	150,00	100,00	14,25	0,00	85,75	12,00	250,00
93	65,00	10,50	162,50	100,00	12,94	0,00	74,56	12,00	250,00
94	70,00	10,50	175,00	100,00	11,63	0,00	63,38	12,00	250,00
95	75,00	10,50	187,50	100,00	10,31	0,00	52,19	12,00	250,00
96	80,00	10,50	200,00	100,00	9,00	0,00	41,00	12,00	250,00

¹suco concentrado (amostra 36)

²gramas

³% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

6.4.2. Análises físico-químicas dos néctares de maçã fabricados em laboratório

Na confecção dos néctares em laboratório, as quantidades de suco polposo (10,5°Brix), açúcar e água, foram balanceadas para produzir néctares a 12°Brix (Tabela 53).

Os valores mensurados de pH variaram de 3,62 a 3,90, com exceção da amostra 80 com valor de 5,50 (Tabela 53).

A acidez titulável teve valores crescentes mensurados de 0,00 a 0,14 grama de ácido málico/100 gramas de néctar. Este padrão, provavelmente foi influenciado

pelas adições crescentes de suco polposo. Como o °Brix foi fixado e a acidez apresentou valores crescentes, o *ratio*, necessariamente, apresentou valores decrescentes de 1200 a 85. Na amostra 80, a acidez mensurada em 0,00 não possibilitou o cálculo do *ratio* (Tabela 53).

Tabela 53. Análises físico-químicas dos néctares fabricados em laboratório.

Nº	Néctar	% Suco	°Brix	pH	Acidez Titulável ¹	Ratio
80	Polposo	0,00	11,90	5,50	0,00	-
81	Polposo	5,00	12,00	3,69	0,01	1200,00
82	Polposo	10,00	12,00	3,82	0,01	1200,00
83	Polposo	15,00	11,90	3,86	0,03	396,67
84	Polposo	20,00	12,00	3,68	0,04	300,00
85	Polposo	25,00	12,10	3,88	0,05	242,00
86	Polposo	30,00	11,90	3,70	0,05	238,00
87	Polposo	35,00	11,90	3,72	0,06	198,33
88	Polposo	40,00	12,00	3,74	0,07	171,43
89	Polposo	45,00	12,00	3,70	0,08	150,00
90	Polposo	50,00	12,10	3,62	0,08	151,25
91	Polposo	55,00	12,00	3,90	0,10	120,00
92	Polposo	60,00	12,00	3,86	0,10	120,00
93	Polposo	65,00	11,90	3,91	0,11	108,18
94	Polposo	70,00	11,90	3,85	0,12	99,17
95	Polposo	75,00	11,90	3,90	0,13	91,54
96	Polposo	80,00	11,90	3,82	0,14	85,00

¹gramas de ácido málico/100 gramas de amostra

6.4.3. Análises físico-químicas dos néctares de maçã comerciais

A concentração de sólidos solúveis mensurada nos néctares comerciais variou de 12,4 a 13,6°Brix. Já o pH mensurado variou de 2,95 a 3,19 (Tabela 54).

A acidez titulável teve valores de 0,20 a 0,38 grama de ácido málico/100 gramas de néctar (Tabela 54).

O *ratio* variou de 32,89 a 62,00 (Tabela 54).

Tabela 54. Análises físico-químicas dos néctares de maçã comerciais.

Nº	Néctar	°Brix	pH	Acidez Titulável ¹	Ratio
3	Polposo	12,90	3,18	0,33	39,09
7	Polposo	13,60	3,19	0,30	45,33
9	Polposo	12,50	3,18	0,38	32,89
12	Polposo	12,50	3,18	0,24	52,08
14	Polposo	12,40	2,95	0,20	62,00
27	Polposo	12,60	3,08	0,25	50,40

¹gramas de ácido málico/100 gramas de amostra

6.4.4. Quantificação teórica de fonte C₃ em néctares de maçã fabricados em laboratório

A partir dos dados da Tabela 52, foi possível calcular, utilizando a Equação 6 (°Brix), a quantidade teórica de fonte C₃ (% sólidos solúveis suco) nas amostra de néctares de maçã fabricados em laboratório (Tabela 55). Estes valores teóricos serão utilizados para verificar a acuidade da mensuração de fonte C₃, calculada de forma prática, em néctares de maçã fabricados em laboratório.

Tabela 55. Porcentagem de sólidos solúveis procedentes de fonte C₃, calculada de forma teórica, em néctares de maçã fabricados em laboratório.

Nº	%Suco ¹	Massa de Sólidos Solúveis do Suco(g)	Massa de Sólidos Solúveis do Açúcar(g)	Massa de Sólidos Solúveis Totais (g)	% Teórica de Sólidos Solúveis Suco (Fonte C ₃)
80	0,00	0,00	30,00	30,00	0,00
81	5,00	1,31	28,69	30,00	4,38
82	10,00	2,63	27,38	30,00	8,75
83	15,00	3,94	26,06	30,00	13,13
84	20,00	5,25	24,75	30,00	17,50
85	25,00	6,56	23,44	30,00	21,88
86	30,00	7,88	22,13	30,00	26,25
87	35,00	9,19	20,81	30,00	30,63
88	40,00	10,50	19,50	30,00	35,00
89	45,00	11,81	18,19	30,00	39,38
90	50,00	13,13	16,88	30,00	43,75
91	55,00	14,44	15,56	30,00	48,13
92	60,00	15,75	14,25	30,00	52,50
93	65,00	17,06	12,94	30,00	56,88
94	70,00	18,38	11,63	30,00	61,25
95	75,00	19,69	10,31	30,00	65,63
96	80,00	21,00	9,00	30,00	70,00

¹suco concentrado polposo (amostra 36) a 10,5°Brix

6.4.5. Análise isotópica dos néctares de maçã fabricados em laboratório

De acordo com a Tabela 56, a variação no enriquecimento isotópico relativo foi de -12,64 a -23,12‰ nos néctares fabricados em laboratório e -12,88 a -23,16‰ para os açúcares purificados extraído dos néctares. As variações no valor isotópico nestas frações são geradas pela adição de suco polposo a 10,5°Brix, que enriquece a amostra.

Para as frações, polpa lavada com água e polpa lavada com acetona, o enriquecimento isotópico relativo variou, respectivamente, de -27,68 a -28,24‰ e -27,60 a -27,71‰. Nas amostras 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 e 87, a adição de até 35% de suco polposo

(M/M), não foi suficiente para a extração do padrão interno (polpa lavada com água e polpa lavada com acetona) (Tabela 56).

Tabela 56. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em néctares fabricados em laboratório e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído dos néctares.

Nº	% Suco ¹	Néctar ($\delta^{13}C$)	D.M. ²	Polpa Água ($\delta^{13}C$)	D.M.	Polpa Acetona ($\delta^{13}C$)	D.M.	Açúcar Purificado ($\delta^{13}C$)	D.M.
80	0,00	-12,64	0,01	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	-12,88	0,07
81	5,00	-13,32	0,01	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	-13,47	0,07
82	10,00	-13,88	0,07	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	-14,05	0,07
83	15,00	-14,69	0,15	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	-14,57	0,01
84	20,00	-15,08	0,06	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	-15,15	0,17
85	25,00	-15,75	0,04	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	-15,60	0,04
86	30,00	-16,42	0,04	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	-16,09	0,08
87	35,00	-17,08	0,05	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	-16,68	0,06
88	40,00	-17,81	0,04	-27,96	0,01	-27,63	0,05	-17,89	0,04
89	45,00	-18,51	0,07	-28,24	0,12	-27,60	0,11	-18,55	0,11
90	50,00	-19,16	0,04	-27,86	0,04	-27,61	0,01	-19,19	0,01
91	55,00	-19,85	0,01	-27,90	0,01	-27,67	0,05	-19,88	0,09
92	60,00	-20,42	0,04	-28,15	0,09	-27,60	0,04	-20,45	0,02
93	65,00	-21,11	0,02	-27,97	0,02	-27,60	0,02	-21,16	0,03
94	70,00	-21,86	0,11	-27,94	0,03	-27,70	0,05	-21,88	0,02
95	75,00	-22,50	0,08	-27,68	0,14	-27,71	0,07	-22,55	0,04
96	80,00	-23,12	0,04	-28,10	0,11	-27,65	0,11	-23,16	0,01

¹% de suco concentrado polposo (amostra 36) adicionado a 10,5°Brix (M/M)

²desvio-médio

Q.I.P.=quantidade insuficiente de polpa extraída dos néctares para proceder à análise isotópica

6.4.6. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C_3 em néctares de maçã fabricados em laboratório

Na fabricação dos néctares em laboratório, foram utilizados como matérias-primas, suco concentrado polposo (amostra 36), açúcar cristal (amostra 38) e água. Conhecendo-se o enriquecimento isotópico relativo do néctar de maçã fabricado em laboratório, da polpa lavada com água, da polpa lavada com acetona, do açúcar purificado extraído destes néctares e do açúcar de cana empregado na sua fabricação, foi possível, utilizando a equação da diluição isotópica (Equação 4), determinar a participação do suco concentrado polposo (Fonte C_3).

- **Polpa lavada com água extraída do néctar fabricado em laboratório (δa) vs. Néctar fabricado em laboratório (δp)**

Substituindo o valor isotópico da polpa lavada com água (Tabela 56) em δa , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o néctar fabricado em laboratório (Tabela 56) em δp , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã ($\%C_3$). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 55) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 57).

Tabela 57. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água extraída do néctar fabricado em laboratório em δa, açúcar cristal em δb e o néctar fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
80	0,00	0,00	Q.I.P. ³	-
81	5,00	4,38	Q.I.P.	-
82	10,00	8,75	Q.I.P.	-
83	15,00	13,13	Q.I.P.	-
84	20,00	17,50	Q.I.P.	-
85	25,00	21,88	Q.I.P.	-
86	30,00	26,25	Q.I.P.	-
87	35,00	30,63	Q.I.P.	-
88	40,00	35,00	33,79	1,21
89	45,00	39,38	37,68	1,70
90	50,00	43,75	42,84	0,91
91	55,00	48,13	47,28	0,85
92	60,00	52,50	50,16	2,34
93	65,00	56,88	55,28	1,60
94	70,00	61,25	60,25	1,00
95	75,00	65,63	65,60	0,03
96	80,00	70,00	67,78	2,22

¹% de suco concentrado polposo (amostra 36) adicionado (M/M)

²1% C₃ teórico - % C₃ prático

Q.I.P.=quantidade insuficiente de polpa extraída dos néctares para proceder à análise isotópica

• **Polpa lavada com água extraída do néctar fabricado em laboratório (δa) vs. Açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório (δp)**

Substituindo o valor isotópico da polpa lavada com água (Tabela 56) em δa, açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o açúcar purificado extraído dos néctares (Tabela 56) em δp, obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã

(%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 55) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 58).

Tabela 58. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com água em δa, açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraído dos néctares em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
80	0,00	0,00	Q.I.P. ³	-
81	5,00	4,38	Q.I.P.	-
82	10,00	8,75	Q.I.P.	-
83	15,00	13,13	Q.I.P.	-
84	20,00	17,50	Q.I.P.	-
85	25,00	21,88	Q.I.P.	-
86	30,00	26,25	Q.I.P.	-
87	35,00	30,63	Q.I.P.	-
88	40,00	35,00	34,31	0,69
89	45,00	39,38	37,94	1,44
90	50,00	43,75	43,04	0,71
91	55,00	48,13	47,48	0,65
92	60,00	52,50	50,39	2,11
93	65,00	56,88	55,61	1,27
94	70,00	61,25	60,42	0,83
95	75,00	65,63	65,94	0,31
96	80,00	70,00	68,03	1,97

¹% de suco concentrado polposo (amostra 36) adicionado (M/M)

² |%C₃ teórico - %C₃ prático|

Q.I.P.=quantidade insuficiente de polpa extraída dos néctares para proceder à análise isotópica

- **Polpa lavada com acetona extraída do néctar fabricado em laboratório (δ_a) vs. Néctar fabricado em laboratório (δ_p)**

Substituindo o valor isotópico da polpa lavada com acetona (Tabela 56) em δ_a , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δ_b e o néctar fabricado em laboratório (Tabela 56) em δ_p , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã ($\%C_3$). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 55) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 59).

Tabela 59. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o néctar fabricado em laboratório em δ_p na equação da diluição isotópica.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
80	0,00	0,00	Q.I.P. ³	-
81	5,00	4,38	Q.I.P.	-
82	10,00	8,75	Q.I.P.	-
83	15,00	13,13	Q.I.P.	-
84	20,00	17,50	Q.I.P.	-
85	25,00	21,88	Q.I.P.	-
86	30,00	26,25	Q.I.P.	-
87	35,00	30,63	Q.I.P.	-
88	40,00	35,00	34,54	0,46
89	45,00	39,38	39,28	0,10
90	50,00	43,75	43,56	0,19
91	55,00	48,13	48,01	0,12
92	60,00	52,50	52,02	0,48
93	65,00	56,88	56,65	0,23
94	70,00	61,25	61,21	0,04
95	75,00	65,63	65,45	0,18
96	80,00	70,00	69,83	0,17

¹% de suco concentrado polposo (amostra 36) adicionado (M/M)

²1% C₃ teórico - % C₃ prático

Q.I.P.=quantidade insuficiente de polpa extraída dos néctares para proceder à análise isotópica

• **Polpa lavada com acetona extraída do néctar fabricado em laboratório (δ_a) vs. Açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório (δ_p)**

Substituindo o valor isotópico da polpa lavada com acetona (Tabela 56) em δ_a , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δ_b e o açúcar purificado extraído dos néctares (Tabela 56) em δ_p , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã

(%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 55) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 60).

Tabela 60. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo da polpa lavada com acetona em δa, açúcar cristal em δb e o açúcar purificado em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórico	% C ₃ Prático	Erro (%) ²
80	0,00	0,00	Q.I.P. ³	-
81	5,00	4,38	Q.I.P.	-
82	10,00	8,75	Q.I.P.	-
83	15,00	13,13	Q.I.P.	-
84	20,00	17,50	Q.I.P.	-
85	25,00	21,88	Q.I.P.	-
86	30,00	26,25	Q.I.P.	-
87	35,00	30,63	Q.I.P.	-
88	40,00	35,00	35,08	0,08
89	45,00	39,38	39,55	0,17
90	50,00	43,75	43,76	0,01
91	55,00	48,13	48,20	0,07
92	60,00	52,50	52,26	0,24
93	65,00	56,88	56,98	0,10
94	70,00	61,25	61,38	0,13
95	75,00	65,63	65,78	0,15
96	80,00	70,00	70,10	0,10

¹% de suco concentrado polposo (amostra 36) adicionado (M/M)

²1%C₃ teórico - %C₃ prático

Q.I.P.=quantidade insuficiente de polpa extraída dos néctares para proceder à análise isotópica

6.4.7. Identificação da combinação mais precisa para a mensuração de fonte C₃ em néctares de maçã fabricados em laboratório

Comparando o valor teórico (balanço de sólidos solúveis) e o valor prático de C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) foi observado que, quando combinamos a polpa lavada com acetona extraída do néctar fabricado em laboratório *vs.* açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório, foi obtido os melhores resultados nas amostras 88, 90, 91, 92, 93 e 96. Quando combinamos a polpa lavada com acetona extraída do néctar fabricado em laboratório *vs.* néctar fabricado em laboratório, foi obtido os melhores resultados nas amostras 89 e 94. Quando a polpa lavada com água extraída do néctar fabricado em laboratório foi combinada com o néctar fabricado em laboratório, somente a amostra 95 teve resultado satisfatório (Tabela 61).

Quando a comparação entre as combinações é realizada com base na somatória dos erros, a melhor combinação foi encontrada utilizando a polpa lavada com acetona extraída do néctar fabricado em laboratório em δ_a *vs.* açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório em δ_p (Tabela 61).

Comparando os melhores resultados e a somatória dos erros para cada combinação, conclui-se que a polpa lavada com acetona extraída do néctar fabricado em laboratório (δ_a) *vs.* açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório (δ_p) apresentou os resultados mais exatos para a quantificação de C₃ em néctares de maçã fabricados em laboratório. Esta combinação será utilizada como padrão para todos os cálculos em néctares de maçã.

Tabela 61. Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C₃ e estimativa de erro nas combinações realizadas de δa e δp em néctar de maçã fabricado em laboratório.

Nº	% Suco ¹	%C ₃ Teórico	PANL x NL	Erro (%) ²	PANL x APNL	Erro (%)	PACNL x NL	Erro (%)	PACNL x APNL	Erro (%)
80	0,00	0,00	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-
81	5,00	4,38	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-
82	10,00	8,75	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-
83	15,00	13,13	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-
84	20,00	17,50	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-
85	25,00	21,88	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-
86	30,00	26,25	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-
87	35,00	30,63	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-	Q.I.P.	-
88	40,00	35,00	33,79	1,21	34,31	0,69	34,54	0,46	35,08	0,08
89	45,00	39,38	37,68	1,70	37,94	1,44	39,28	0,10	39,55	0,17
90	50,00	43,75	42,84	0,91	43,04	0,71	43,56	0,19	43,76	0,01
91	55,00	48,13	47,28	0,85	47,48	0,65	48,01	0,12	48,20	0,07
92	60,00	52,50	50,16	2,34	50,39	2,11	52,02	0,48	52,26	0,24
93	65,00	56,88	55,28	1,60	55,61	1,27	56,65	0,23	56,98	0,10
94	70,00	61,25	60,25	1,00	60,42	0,83	61,21	0,04	61,38	0,13
95	75,00	65,63	65,60	0,03	65,94	0,31	65,45	0,18	65,78	0,15
96	80,00	70,00	67,78	2,22	68,03	1,97	69,83	0,17	70,10	0,10
Somatória dos Erros				11,86		9,98		1,97		1,05

¹%de suco concentrado polposo (amostra 36) adicionado (M/M)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

Q.I.P.=quantidade insuficiente de polpa extraída dos néctares para proceder à análise isotópica

negrito = resultados mais exatos em relação a % teórica de fonte C₃

PANL x NL - polpa lavada com água extraída do néctar fabricado em laboratório (δa) vs. néctar fabricado em laboratório (δp)

PANL x APNL - polpa lavada com água extraída do néctar fabricado em laboratório (δa) vs. açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório (δp)

PACNL x NL - polpa lavada com acetona extraída do néctar fabricado em laboratório (δa) vs. néctar fabricado em laboratório (δp)

PACNL x APNL - polpa lavada com acetona extraída do néctar fabricado em laboratório (δa) vs. açúcar purificado extraído do néctar fabricado em laboratório (δp)

6.4.8. Comparação da mensuração de fonte C₃ entre néctares de maçã fabricados sem aditivos e néctares fabricados com aditivos

A comparação estatística foi realizada entre sucos fabricados com a mesma porcentagem de açúcar adicionado. Utilizando o Teste *t* para amostras pareadas ($\alpha < 0,05$), não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados comparados nas mesmas porcentagens de açúcar adicionado (Tabela 62).

Tabela 62. Comparação da mensuração de fonte C₃ entre néctares fabricados sem aditivos e néctares fabricados com aditivos.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórica	Néctar	% C ₃ Prática ³	Erro (%) ²
121	40,00	35,00	Sem aditivos	34,94 a	0,35
121.1	40,00	35,00	Com aditivos	35,29 a	
122	50,00	43,75	Sem aditivos	43,51 b	0,21
122.1	50,00	43,75	Com aditivos	43,72 b	
123	60,00	52,50	Sem aditivos	52,21 c	0,77
123.1	60,00	52,50	Com aditivos	52,98 c	
124	70,00	61,25	Sem aditivos	61,82 d	0,70
124.1	70,00	61,25	Com aditivos	61,12 d	
125	80,00	70,00	Sem aditivos	70,36 e	0,56
125.1	80,00	70,00	Com aditivos	69,80 e	

¹%de suco concentrado polposo (amostra 36) adicionado (M/M)

²%C₃ sem aditivo - %C₃ com aditivo

³letras em comum não diferem estatisticamente (Teste *t* para amostras pareadas, $\alpha < 0,05$)

6.4.9. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C₃ em néctares de maçã fabricados em laboratório

A participação de fonte C₃, em néctares de maçã, pode ser quantificada utilizando duas equações: Equação 4 (diluição isotópica simples) e Equação 5 (diluição isotópica com fatores de correção). Na Equação 5, foi adotado o fator de correção máximo (A=0,91) e o fator de correção mínimo (A=0,84) com base na participação dos açúcares da maçã na composição dos sólidos solúveis dos sucos concentrados (Tabela 10).

Para quantificar a participação de fonte C_3 em néctares de maçã, foi adotado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares fabricados em laboratório para a fonte C_3 (δa) (Tabela 56), a média do valor isotópico para a fonte C_4 (açúcar de cana - δb) com valor isotópico de $-12,72\text{‰}$ (Tabela 12) e o açúcar purificado extraído do néctar de maçã fabricado em laboratório (δb) (Tabela 56).

De acordo com a Tabela 63, a participação de fonte C_3 em néctares de maçã, calculada pela Equação 4, obteve os melhores resultados em todas as amostras.

A comparação das equações também foi feita pela somatória dos erros. Dessa forma, a equação que teve os resultados práticos de C_3 mais próximos dos resultados teóricos novamente foi a 4 (diluição isotópica simples) (Tabela 63).

Tabela 63. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ calculados por meio das equações 4 e 5 em néctares de maçã.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórico	Equação 4		Equação 5			
			% C ₃	Erro (%) ²	% C ₃ (0,91) ³	Erro (%)	% C ₃ (0,84) ³	Erro (%)
80	0,00	0,00	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.
81	5,00	4,38	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.
82	10,00	8,75	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.
83	15,00	13,13	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.
84	20,00	17,50	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.
85	25,00	21,88	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.
86	30,00	26,25	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.
87	35,00	30,63	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.	Q.I.P.
88	40,00	35,00	34,69	0,31	36,85	1,85	38,73	3,73
89	45,00	39,38	39,18	0,20	41,45	2,07	43,40	4,02
90	50,00	43,75	43,42	0,33	45,75	2,00	47,74	3,99
91	55,00	48,13	47,89	0,24	50,25	2,12	52,25	4,12
92	60,00	52,50	51,97	0,53	54,31	1,81	56,29	3,79
93	65,00	56,88	56,72	0,16	59,02	2,14	60,94	4,06
94	70,00	61,25	61,15	0,10	63,36	2,11	65,20	3,95
95	75,00	65,63	65,58	0,05	67,67	2,05	69,40	3,77
96	80,00	70,00	69,92	0,08	71,86	1,86	73,45	3,45
Somatória dos Erros				2,00		18,01		34,88

¹%de suco concentrado polposo (amostra 36) adicionado (M/M)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

³fator de correção (A) mensurado com base na participação dos açúcares da maçã na composição do °Brix

Q.I.P. = quantidade insuficiente de polpa extraída dos néctares para proceder à análise isotópica

negrito = resultados mais exatos em relação a % teórica de fonte C₃

A Equação 4 obteve os resultados mais exatos para néctares de maçã fabricados em laboratório. Portanto, esta equação foi a utilizada para calcular a participação de fonte C₃ nas amostras de néctares de maçã comerciais.

6.4.10. Concepção do limite de legalidade para néctares de maçã

Para determinar a legalidade dos néctares comerciais, é necessária a criação do limite de legalidade. O limite de legalidade fornece a concentração mínima de fonte C₃ que um néctar de maçã deve ter para ser considerado legal, diante a legislação brasileira. Este cálculo foi empregado em néctares de maçã com concentrações de sólidos solúveis finais em 10,5; 11,0; 11,5; 12,0; 12,5; 13,0; 13,5 e 14,0°Brix adicionados de 30% de suco polposo (M/M) (quantidade mínima de suco polposo permitida pela legislação brasileira) (Tabela 64).

Tabela 64. Balanço de massa para néctares de maçã adicionados com 30% de suco de maçã polposo (M/M).

Nº	% Suco	°Brix Inicial do Suco	g ¹ Suco	°Brix Açúcar	g Açúcar	°Brix Água	g Água	°Brix Final do Néctar	g Néctar
156	30,00	10,50	75,00	100,00	17,12	0,00	157,87	10,00	250,00
157	30,00	10,50	75,00	100,00	18,37	0,00	156,62	10,50	250,00
158	30,00	10,50	75,00	100,00	19,62	0,00	155,37	11,00	250,00
159	30,00	10,50	75,00	100,00	20,87	0,00	154,12	11,50	250,00
160	30,00	10,50	75,00	100,00	22,12	0,00	152,87	12,00	250,00
161	30,00	10,50	75,00	100,00	23,37	0,00	151,62	12,50	250,00
162	30,00	10,50	75,00	100,00	24,62	0,00	150,37	13,00	250,00
163	30,00	10,50	75,00	100,00	25,87	0,00	149,12	13,50	250,00
164	30,00	10,50	75,00	100,00	27,12	0,00	147,87	14,00	250,00
165	30,00	10,50	75,00	100,00	28,37	0,00	146,62	14,50	250,00
166	30,00	10,50	75,00	100,00	29,62	0,00	145,37	15,00	250,00

¹gramas

A partir dos dados da Tabela 64, foi possível calcular, utilizando a Equação 6 (°Brix), a porcentagem mínima de sólidos solúveis dos sucos (fonte C₃), após a adição de 30% de suco polposo (M/M) a 10,5°Brix nas amostras de néctar (Tabela 65).

Tabela 65. Porcentagem mínima de sólidos solúveis procedentes de fonte C₃ em néctares de maçã com adição de 30% de suco polposo de maçã (M/M).

Nº	°Brix Final do Néctar	Massa de Sólidos Solúveis do Suco(g)	Massa de Sólidos Solúveis do Açúcar(g)	Massa de Sólidos Solúveis Totais (g)	%Sólidos Solúveis Suco (Fonte C ₃) Limite de Legalidade
156	10,00	7,88	17,13	25,00	31,50
157	10,50	7,88	18,38	26,25	30,00
158	11,00	7,88	19,63	27,50	28,64
159	11,50	7,88	20,88	28,75	27,39
160	12,00	7,88	22,13	30,00	26,25
161	12,50	7,88	23,38	31,25	25,20
162	13,00	7,88	24,63	32,50	24,23
163	13,50	7,88	25,88	33,75	23,33
164	14,00	7,88	27,13	35,00	22,50
165	14,50	7,88	28,38	36,25	21,72
166	15,00	7,88	29,63	37,50	21,00

Na Tabela 65 estão representados os valores do limite de legalidade de néctares de maçã comerciais. Os valores da quantificação de fonte C₃ que estiverem acima do limite de legalidade foram considerados legais. Caso estes valores estejam abaixo deste limite, estes produtos foram considerados adulterados conforme a legislação brasileira para néctares de maçã comerciais.

6.4.11. Análise isotópica e determinação da legalidade dos néctares comerciais de maçã

De acordo com a Tabela 66, a variação no enriquecimento isotópico relativo foi de -17,08 a -19,27‰ nos néctares comerciais e -17,52 a -19,55‰ para os açúcares purificados extraído destes néctares. Para as frações polpa lavada com água e polpa lavada com acetona, o enriquecimento isotópico relativo variou, respectivamente, de -27,65 a -30,84‰ e -27,51 a -29,29‰.

Tabela 66. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em néctares comerciais e nas frações da polpa lavada com água, polpa lavada com acetona e açúcar purificado extraído destes néctares.

Nº	Descrição	Néctar		Polpa		Polpa		Açúcar	
		($\delta\text{‰}$)	D.M. ¹	Água ($\delta\text{‰}$)	D.M.	Acetona ($\delta\text{‰}$)	D.M.	Purificado ($\delta\text{‰}$)	D.M.
3	Néctar	-17,47	0,13	-28,58	0,11	-28,49	0,05	-17,62	0,06
7	Néctar	-19,27	0,06	-30,84	0,02	-29,29	0,15	-19,55	0,01
9	Néctar	-18,61	0,04	-27,65	0,02	-27,60	0,04	-18,51	0,01
12	Néctar	-17,56	0,06	-28,04	0,18	-28,05	0,01	-17,76	0,07
14	Néctar	-17,08	0,04	-28,38	0,06	-27,88	0,04	-17,76	0,03
27	Néctar	-17,36	0,12	-27,86	0,02	-27,51	0,08	-17,52	0,07

¹desvio-médio

Para determinar a legalidade em néctares de maçã comerciais, foi utilizado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares comerciais como padrão para δ_a (Tabela 66), três valores isotópicos como padrões para δ_b e o valor isotópico do açúcar purificado extraído do néctar comercial para δ_p (Tabela 66). Em δ_b (açúcar de cana – Tabela 12) foi empregado o valor isotópico de $-13,06\text{‰}$ (amostra 38.13) como padrão do valor isotópico mais leve, $-12,51\text{‰}$ (amostra 38.14) como padrão do valor isotópico mais pesado e $-12,72\text{‰}$ como padrão médio das amostras de açúcares. O valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares comerciais como padrão para δ_a foi combinado com o valor isotópico mais leve, o valor isotópico médio e o valor isotópico mais pesado para δ_b conforme as Tabelas 67, 68 e 69.

Tabela 67. Quantificação de fonte C₃ em néctares de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares de maçã comerciais em δa , o valor isotópico mais leve do açúcar de cana em δb (-13,06‰) e o açúcar purificado extraído do néctar comercial em δp .

Nº	°Brix	Polpa Lavada com Acetona (δa) ($\delta\text{‰}$)	Açúcar de Cana (δb) ($\delta\text{‰}$)	Açúcar Purificado (δp) ($\delta\text{‰}$)	%C ₃
3	12,90	-28,49	-13,06	-17,62	29,53
7	13,60	-29,29	-13,06	-19,55	40,00
9	12,50	-27,60	-13,06	-18,51	37,48
12	12,50	-28,05	-13,06	-17,76	31,32
14	12,40	-27,88	-13,06	-17,76	31,69
27	12,60	-27,51	-13,06	-17,52	30,83

Tabela 68. Quantificação de fonte C₃ em néctares de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares de maçã comerciais em δa , o valor isotópico médio do açúcar de cana em δb (-12,72‰) e o açúcar purificado extraído do néctar comercial em δp .

Nº	°Brix	Polpa Lavada com Acetona (δa) ($\delta\text{‰}$)	Açúcar de Cana (δb) ($\delta\text{‰}$)	Açúcar Purificado (δp) ($\delta\text{‰}$)	%C ₃
3	12,90	-28,49	-12,72	-17,62	31,05
7	13,60	-29,29	-12,72	-19,55	41,23
9	12,50	-27,60	-12,72	-18,51	38,91
12	12,50	-28,05	-12,72	-17,76	32,84
14	12,40	-27,88	-12,72	-17,76	33,22
27	12,60	-27,51	-12,72	-17,52	32,42

Tabela 69. Quantificação de fonte C₃ em néctares de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico da polpa lavada com acetona extraída dos néctares de maçã comerciais em δa , o valor isotópico mais pesado do açúcar de cana em δb (-12,51‰) e o açúcar purificado extraído do néctar comercial em δp .

N°	°Brix	Polpa Lavada com Acetona (δa) ($\delta\%$)	Açúcar de Cana (δb) ($\delta\%$)	Açúcar Purificado (δp) ($\delta\%$)	% C ₃
3	12,90	-28,49	-12,51	-17,62	31,96
7	13,60	-29,29	-12,51	-19,55	41,97
9	12,50	-27,60	-12,51	-18,51	39,76
12	12,50	-28,05	-12,51	-17,76	33,75
14	12,40	-27,88	-12,51	-17,76	34,14
27	12,60	-27,51	-12,51	-17,52	33,37

De acordo com as Tabelas 67 e 69, a quantidade de fonte C₃ calculada para as amostras 3, 7, 9, 12, 14 e 27 variaram, respectivamente, de 29,53 a 31,96%, 40,00 a 41,97%, 37,48 a 39,76%, 31,32 a 33,75%, 31,69 a 34,14% e 30,83 a 33,37%. Portanto, a diferença entre a quantificação máxima e a mínima de fonte C₃ em néctares de maçã comerciais não supera 2,54%. Em néctares de maçã comerciais, a quantificação máxima e a mínima de fonte C₃ teve maior variação que a observada em sucos polposos comerciais (0,45%). Neste produto (suco polposos), a concentração de fonte C₃ se aproxima de 100% e, portanto, o valor isotópico da fonte C₄ tem pouca influência na quantificação da fonte C₃. Já para néctar de maçã a concentração de fonte C₃ varia em 27%. Logo, o valor isotópico da fonte C₄ influencia diretamente na quantificação da fonte C₃. Este fato contribui para que o néctar de maçã comercial tenha maior diferença entre a quantificação máxima e a quantificação mínima de fonte C₃ que a observada em sucos polposos de maçã comerciais.

A legislação brasileira determina que os néctares de maçã devem conter, no mínimo, 30% (M/M) de suco polposos de maçã (BRASIL, 2003a). Relacionando as quantidades de fonte C₃ ao °Brix dos néctares comerciais (Figura 3), as amostras 3, 7, 9, 12, 14 e 27 estão de acordo com a legislação brasileira.

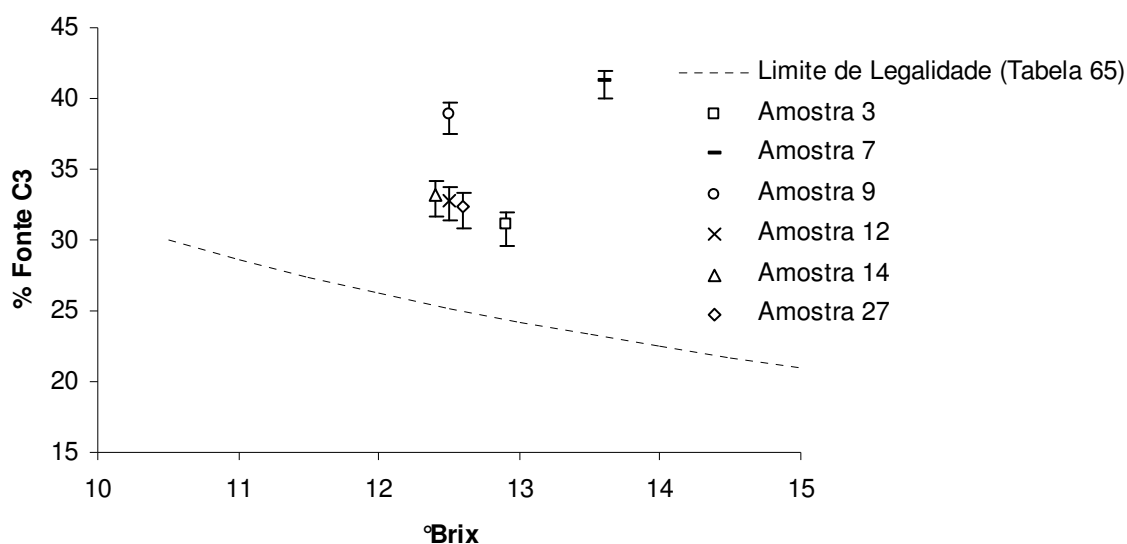


Figura 3. Relação entre a quantidade de fonte C₃ e o °Brix para classificar a legalidade dos néctares de maçã comerciais.

6.4.12. Análises energéticas em néctares de maçã comerciais

A composição centesimal dos néctares de maçã comerciais esta representada na Tabela 70.

Tabela 70. Composição centesimal de néctares de maçã comerciais.

Nº	Produto	Carboidrato (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
3	Néctar	10,02	0,31	0,24	0,04	89,39
7	Néctar	10,33	0,24	0,23	0,13	89,08
9	Néctar	9,06	0,29	0,56	0,03	90,06
12	Néctar	9,74	0,35	0,34	0,05	89,52
14	Néctar	9,13	0,27	0,81	0,04	89,76
27	Néctar	10,00	0,30	0,30	0,05	89,35

Com base nos dados da Tabela 70 e utilizando os fatores de correção propostos pela ANVISA (BRASIL, 1999), foi mensurado o cálculo centesimal para os néctares de maçã comerciais (Tabela 71).

Quando o valor energético informado no rótulo dos néctares comerciais foi comparado com o valor energético mensurado pelo cálculo centesimal e bomba calorimétrica, ambos os métodos (cálculo e bomba) apresentaram resultados inferiores aos valores energéticos dos rótulos. Esta observação também foi relatada para suco clarificado e suco polposo de maçã comercial (Tabela 51).

Conforme determinado pela ANVISA, para néctares são considerados fora dos padrões de qualidade os valores dos rótulos dos produtos que não estiverem dentro do intervalo de tolerância de $\pm 20\%$ (BRASIL, 2003b). Dessa forma, comparando os valores energéticos do cálculo centesimal com os valores mencionados no rótulo dos néctares comerciais, foi possível concluir que todas as amostras estão de acordo com as normas de ANVISA. Quando esta comparação é feita com os valores energéticos mensurados pela bomba calorimétrica, as amostras 3 e 7 tiveram resultados abaixo do intervalo de tolerância de $\pm 20\%$ e, portanto, estão fora da norma determinada pela ANVISA. As amostras 9, 12, 14 e 27 apresentam seus valores energéticos, mensurados pela bomba calorimétrica, no intervalo de tolerância de $\pm 20\%$. Dessa forma estão em acordo com a norma da ANVISA.

Tabela 71. Comparação entre o valor energético fornecido no rótulo dos néctares de maçã comerciais e os valores estimados do cálculo centesimal e bomba calorimétrica.

Valores Referentes a 200ml de Néctar de Maçã Comercial											
N°	Produto	Rótulo		Limite +20% ¹		Limite -20% ¹		Cálculo		Bomba Calorimétrica	
		Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ
3	Néctar	118,00	493,24	141,60	591,89	94,40	394,59	86,90	363,24	80,13	334,95
7	Néctar	120,00	501,60	144,00	601,92	96,00	401,28	88,64	370,50	80,05	334,62
9	Néctar	100,00	418,00	120,00	501,60	80,00	334,40	84,91	354,91	80,03	334,53
12	Néctar	100,00	418,00	120,00	501,60	80,00	334,40	86,89	363,21	80,10	334,81
14	Néctar	90,00	376,20	108,00	451,44	72,00	300,96	89,65	374,75	80,09	334,76
27	Néctar	100,00	418,00	120,00	501,60	80,00	334,40	87,79	366,98	80,12	334,90

¹Limite de $\pm 20\%$ calculado sobre os valores informados nos rótulos dos produtos comerciais

6.5. Refrigerante de Maçã

6.5.1. Produção em laboratório de refrigerantes de maçã

Utilizando o suco de maçã concentrado clarificado (padrão para refrigerante), água e açúcar de cana, foram produzidos, em laboratório, refrigerantes de maçã com concentração de sólidos solúveis final em 10,4°Brix (menor valor encontrado nos produtos comerciais). Os refrigerantes foram fabricados com quantidades crescentes de suco clarificado (padrão para refrigerante - amostra 18) a 10°Brix nas concentrações de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10% (V/V) (Tabela 72).

Tabela 72. Balanço de massa para refrigerantes de maçã produzidos com 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10% (V/V) de suco clarificado (padrão para refrigerante) a 10°Brix.

Nº	%Suco ¹	°Brix Suco	mL Suco	°Brix Açúcar ²	g ³ Açúcar	°Brix Água	mL Água	°Brix Refrigerante	mL Refrigerante
100	0,00	10,00	0,00	100,00	27,08	0,00	233,34	10,40	250,00
101	1,00	10,00	2,50	100,00	26,82	0,00	231,00	10,40	250,00
102	2,00	10,00	5,00	100,00	26,56	0,00	228,66	10,40	250,00
103	3,00	10,00	7,50	100,00	26,30	0,00	226,32	10,40	250,00
104	4,00	10,00	10,00	100,00	26,04	0,00	223,98	10,40	250,00
105	5,00	10,00	12,50	100,00	25,78	0,00	221,64	10,40	250,00
106	6,00	10,00	15,00	100,00	25,52	0,00	219,30	10,40	250,00
107	7,00	10,00	17,50	100,00	25,26	0,00	216,96	10,40	250,00
108	8,00	10,00	20,00	100,00	25,00	0,00	214,62	10,40	250,00
109	9,00	10,00	22,50	100,00	24,74	0,00	212,28	10,40	250,00
110	10,00	10,00	25,00	100,00	24,48	0,00	209,94	10,40	250,00

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²% de açúcar (amostra 38) adicionado (M/M)

³gramas

6.5.2. Análises físico-químicas dos refrigerantes de maçã fabricados em laboratório

Na fabricação dos refrigerantes em laboratório, as quantidades de suco clarificado (10°Brix), açúcar e água, foram balanceadas para produzir refrigerantes a 10,4°Brix (Tabela 73).

O pH teve valores decrescentes de 7,22 a 4,17 acompanhando a adição crescente de suco clarificado. Portanto, a adição de suco favorece a queda do pH em refrigerantes de maçã (Tabela 73).

A acidez titulável teve valores mensurados de 0,000 a 0,014 grama de ácido málico/100 gramas de refrigerante (Tabela 73). Como ocorrido em néctares fabricados em laboratório, a adição crescente de suco clarificado aos refrigerantes, proporcionou o aumento crescente da acidez.

Com o °Brix em torno de 10,4 e a acidez titulável com padrão crescente, o *ratio*, necessariamente, apresentou valores decrescentes de 5200 a 742,86 (Tabela 73).

Tabela 73. Análises físico-químicas dos refrigerantes fabricados em laboratório.

Nº	Refrigerante	% Suco ¹	°Brix	pH	Acidez Titulável ²	Ratio
100	Clarificado	0,00	10,40	7,22	0,000	-
101	Clarificado	1,00	10,40	6,19	0,002	5200,00
102	Clarificado	2,00	10,40	5,54	0,003	3466,67
103	Clarificado	3,00	10,40	4,97	0,006	1733,33
104	Clarificado	4,00	10,40	4,61	0,009	1155,56
105	Clarificado	5,00	10,40	4,49	0,011	945,45
106	Clarificado	6,00	10,40	4,40	0,010	1040,00
107	Clarificado	7,00	10,40	4,18	0,011	945,45
108	Clarificado	8,00	10,40	4,20	0,012	866,67
109	Clarificado	9,00	10,30	4,17	0,014	735,71
110	Clarificado	10,00	10,40	4,17	0,014	742,86

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²gramas de ácido málico/100ml de amostra

6.5.3. Análises físico-químicas dos refrigerantes de maçã comerciais

A concentração de sólidos solúveis nas amostras 29, 32 e 33 foi de 10,6; 12,1 e 10,4°Brix, respectivamente. Para as análises de pH a variação foi de 3,39 a 3,65 (Tabela 74).

A acidez titulável em refrigerantes comerciais de maçã variou de 0,08 a 0,13 grama de ácido málico/100ml de refrigerante (Tabela 74). Dessa forma, podemos concluir que a acidez está de acordo com as normas do MAPA que estabelece valores mínimos de 0,02 grama de ácido málico/100ml de refrigerante de maçã (BRASIL, 1998).

A razão °Brix/acidez titulável variou entre 93,07 a 130,00 (Tabela 74).

Tabela 74. Análises físico-químicas dos refrigerantes comerciais de maçã.

Nº	Refrigerante	°Brix	pH	Acidez Titulável ¹	Ratio
29	Clarificado	10,60	3,54	0,10	106,00
32	Clarificado	12,10	3,22	0,13	93,07
33	Clarificado	10,40	3,44	0,08	130,00

¹gramas de ácido málico/100ml de amostra

6.5.4. Quantificação teórica de fonte C₃ em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório

A partir dos dados da Tabela 72, foi possível calcular, utilizando a Equação 6 (°Brix), a quantidade teórica de fonte C₃ (% sólidos solúveis suco) nas amostra de refrigerantes de maçã fabricados em laboratório (Tabela 75). Estes valores teóricos serão utilizados para verificar a acuidade da mensuração de fonte C₃, calculada de forma prática, em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório.

Tabela 75. Porcentagem de sólidos solúveis procedentes de fonte C₃, calculada de forma teórica, em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório.

Nº	% Suco ¹	Massa de Sólidos Solúveis do Suco(g)	Massa de Sólidos Solúveis do Açúcar(g)	Massa de Sólidos Solúveis Totais (g)	% Teórica de Sólidos Solúveis Suco (Fonte C ₃)
100	0,00	0,00	27,08	27,08	0,00
101	1,00	0,26	26,82	27,08	0,96
102	2,00	0,52	26,56	27,08	1,92
103	3,00	0,78	26,30	27,08	2,88
104	4,00	1,04	26,04	27,08	3,84
105	5,00	1,30	25,78	27,08	4,80
106	6,00	1,56	25,52	27,08	5,76
107	7,00	1,82	25,26	27,08	6,72
108	8,00	2,08	25,00	27,08	7,68
109	9,00	2,34	24,74	27,08	8,64
110	10,00	2,60	24,48	27,08	9,60

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

6.5.5. Análise isotópica dos refrigerantes de maçã fabricados em laboratório

Conforme a Tabela 76, a variação no enriquecimento isotópico relativo foi de -14,37 a -12,64‰ nos refrigerantes fabricados em laboratório e -14,18 a -12,88‰ para o açúcar purificado extraído destes refrigerantes. As variações no valor isotópico nestas amostras seguem as adições crescentes de suco clarificado a 10°Brix. Porém, como as adições são em pequenas quantidades, os desvios-médios entre algumas amostras podem se sobrepor, dificultando resultados mais exatos.

Tabela 76. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório e na fração do açúcar purificado extraídos destes refrigerantes.

Nº	% Suco ¹	Refrigerante ($\delta\text{‰}$)	D.M. ²	Açúcar Purificado ($\delta\text{‰}$)	D.M.
100	0,00	-12,64	0,01	-12,82	0,12
101	1,00	-12,99	0,01	-12,91	0,04
102	2,00	-13,19	0,02	-13,05	0,11
103	3,00	-13,37	0,11	-13,14	0,04
104	4,00	-13,46	0,11	-13,24	0,16
105	5,00	-13,51	0,01	-13,43	0,04
106	6,00	-13,56	0,03	-13,72	0,01
107	7,00	-13,80	0,13	-13,76	0,09
108	8,00	-13,98	0,08	-13,81	0,05
109	9,00	-13,99	0,07	-13,98	0,02
110	10,00	-14,37	0,08	-14,18	0,02

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²desvio-médio

6.5.6. Definição dos melhores parâmetros de δa , δb e δp para quantificar a participação de fonte C₃ em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório

Na fabricação dos refrigerantes de laboratório, foram utilizadas como matérias-primas, suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18), açúcar cristal (amostra 38) e água. Conhecendo-se o enriquecimento isotópico relativo do refrigerante fabricado em laboratório, do açúcar purificado extraído destes refrigerantes e das matérias-primas empregada na sua fabricação, foi possível, utilizando a equação da diluição isotópica (Equação 4), determinar a participação do suco clarificado de maçã para refrigerante (Fonte C₃).

- **Suco concentrado (δa) vs. Refrigerante fabricado em laboratório (δp)**

Substituindo o valor isotópico do suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18 – Tabela 11) em δa , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o refrigerante fabricado em laboratório (Tabela 76) em δp , obteve-se a quantificação prática das

matérias-primas de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 75) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 77).

Tabela 77. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado para refrigerante em δa, açúcar cristal em δb e o refrigerante fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórica	% C ₃ Prática	Erro (%) ²
100	0,00	0,00	0,07	0,07
101	1,00	0,96	2,41	1,45
102	2,00	1,92	3,79	1,87
103	3,00	2,88	5,01	2,13
104	4,00	3,84	5,62	1,78
105	5,00	4,80	5,93	1,13
106	6,00	5,76	6,27	0,51
107	7,00	6,72	7,93	1,21
108	8,00	7,68	9,11	1,43
109	9,00	8,64	9,18	0,54
110	10,00	9,60	11,75	2,15

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

- **Açúcar purificado extraído do suco concentrado (δa) vs. Refrigerante fabricado em laboratório (δp)**

Substituindo o valor isotópico do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18 – Tabela 11) em δa, açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o refrigerante fabricado em laboratório (Tabela 76) em δp, obteve-se a quantificação prática das matérias-primas de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 75) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 78).

Tabela 78. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado para refrigerante em δa, açúcar cristal em δb e o refrigerante fabricado em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórica	% C ₃ Prática	Erro (%) ²
100	0,00	0,00	0,07	0,07
101	1,00	0,96	2,35	1,39
102	2,00	1,92	3,70	1,78
103	3,00	2,88	4,89	2,01
104	4,00	3,84	5,49	1,65
105	5,00	4,80	5,78	0,98
106	6,00	5,76	6,11	0,35
107	7,00	6,72	7,73	1,01
108	8,00	7,68	8,89	1,21
109	9,00	8,64	8,96	0,32
110	10,00	9,60	11,47	1,87

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

- **Suco concentrado (δa) vs. Açúcar purificado extraído do refrigerante fabricado em laboratório (δp)**

Substituindo o valor isotópico do suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18 – Tabela 11) em δa, açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório (Tabela 76) em δp, obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 75) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 79).

Tabela 79. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do suco concentrado clarificado para refrigerante em δa , açúcar cristal em δb e o açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório em δp na equação da diluição isotópica.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórica	% C ₃ Prática	Erro (%) ²
100	0,00	0,00	1,29	1,29
101	1,00	0,96	1,90	0,94
102	2,00	1,92	2,85	0,93
103	3,00	2,88	3,46	0,58
104	4,00	3,84	4,13	0,29
105	5,00	4,80	5,42	0,62
106	6,00	5,76	7,35	1,59
107	7,00	6,72	7,62	0,90
108	8,00	7,68	7,99	0,31
109	9,00	8,64	9,15	0,51
110	10,00	9,60	10,50	0,90

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

- **Açúcar purificado extraído do suco concentrado (δa) vs. Açúcar purificado extraído do refrigerante fabricado em laboratório (δp)**

Substituindo o valor isotópico do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18 – Tabela 11) em δa , açúcar cristal (amostra 38 – Tabela 12) em δb e o açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório (Tabela 76) em δp , obteve-se a quantificação prática da matéria-prima de maçã (%C₃). Este valor prático foi comparado com o valor teórico (Tabela 75) para verificar a acuidade desta combinação (Tabela 80).

Tabela 80. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) utilizando o enriquecimento isotópico relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado para refrigerante em δ_a , açúcar cristal em δ_b e o açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório em δ_p na equação da diluição isotópica.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórica	% C ₃ Prática	Erro (%) ²
100	0,00	0,00	1,26	1,26
101	1,00	0,96	1,85	0,89
102	2,00	1,92	2,78	0,86
103	3,00	2,88	3,37	0,49
104	4,00	3,84	4,03	0,19
105	5,00	4,80	5,29	0,49
106	6,00	5,76	7,17	1,41
107	7,00	6,72	7,44	0,72
108	8,00	7,68	7,80	0,12
109	9,00	8,64	8,92	0,28
110	10,00	9,60	10,24	0,64

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²1% C₃ teórico - % C₃ prático

6.5.7. Identificação da combinação mais precisa para a mensuração da fonte C₃ em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório

Comparando o valor teórico (balanço de sólidos solúveis) com o valor prático de fonte C₃ (mensurados no espectrômetro de massa) observamos que, quando combinamos o açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δ_a) vs. açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório (δ_p), obtemos os melhores resultados nas amostras 101, 102, 103, 104, 105, 107, 108, 109 e 110. Combinando o açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δ_a) vs. refrigerante fabricado em laboratório (δ_p), obtemos os melhores resultados nas amostras 100 e 106. A combinação do suco concentrado clarificado para refrigerante (δ_a) vs. refrigerante fabricado em laboratório (δ_p), teve somente a amostra 100 com resultado satisfatório (Tabela 81).

Quando a comparação entre as combinações é realizada com base na somatória dos erros, a melhor combinação foi encontrada utilizando o açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δ_a) vs. açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório (δ_p) (Tabela 81).

Comparando os melhores resultados e a somatória dos erros para cada combinação, conclui-se que o açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado em δ_a vs. açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório em δ_p , é a mais indicada para a quantificação de fonte C₃ em refrigerantes de maçã fabricados em laboratório. Esta combinação será utilizada como padrão para todos os cálculos em refrigerantes de maçã.

Tabela 81. Comparação entre o valor teórico e o valor prático de fonte C₃ e estimativa de erro nas combinações realizadas de δ_a e δ_p em refrigerante de maçã fabricado em laboratório.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórica	SC x RL	Erro (%) ²	APSC x RL	Erro (%)	SC x APRL	Erro (%)	APSC x APRL	Erro (%)
100	0,00	0,00	0,07	0,07	0,07	0,07	1,29	1,29	1,26	1,26
101	1,00	0,96	2,41	1,45	2,35	1,39	1,90	0,94	1,85	0,89
102	2,00	1,92	3,79	1,87	3,70	1,78	2,85	0,93	2,78	0,86
103	3,00	2,88	5,01	2,13	4,89	2,01	3,46	0,58	3,37	0,49
104	4,00	3,84	5,62	1,78	5,49	1,65	4,13	0,29	4,03	0,19
105	5,00	4,80	5,93	1,13	5,78	0,98	5,42	0,62	5,29	0,49
106	6,00	5,76	6,27	0,51	6,11	0,35	7,35	1,59	7,17	1,41
107	7,00	6,72	7,93	1,21	7,73	1,01	7,62	0,90	7,44	0,72
108	8,00	7,68	9,11	1,43	8,89	1,21	7,99	0,31	7,80	0,12
109	9,00	8,64	9,18	0,54	8,96	0,32	9,15	0,51	8,92	0,28
110	10,00	9,60	11,75	2,15	11,47	1,87	10,50	0,90	10,24	0,64
Somatória dos Erros				14,27		12,64		8,86		7,35

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²1%C₃ teórico - %C₃ prático

negrito = resultados mais exatos em relação a % teórica de fonte C₃

SC x RL - suco concentrado clarificado (δ_a) vs. refrigerante fabricado em laboratório (δ_p)

APSC x RL - açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δ_a) vs. refrigerante fabricado em laboratório (δ_p)

SC x APRL - suco concentrado clarificado (δ_a) vs. açúcar purificado extraído do refrigerante fabricado em laboratório (δ_p)

APSC x APRL - açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (δ_a) vs. açúcar purificado extraído dos refrigerantes fabricados em laboratório (δ_p)

6.5.8. Comparação da mensuração de fonte C₃ entre refrigerantes de maçã fabricados sem aditivos e refrigerantes fabricados com aditivos

A comparação estatística foi realizada entre refrigerantes fabricados com a mesma porcentagem de açúcar adicionado. Utilizando o Teste *t* para amostras pareadas ($\alpha < 0,05$), não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados comparados nas mesmas porcentagens de açúcar adicionado (Tabela 82).

Tabela 82. Comparação da mensuração de fonte C₃ entre refrigerantes fabricados sem aditivos e refrigerantes fabricados com aditivos.

Nº	% Suco ¹	% C ₃ Teórica	Refrigerante	% C ₃ Prática ³	Erro (%) ²
127	0,00	0,00	Sem aditivos	1,42 a	0,27
127.1	0,00	0,00	Com aditivos	1,15 a	
128	2,00	1,92	Sem aditivos	2,09 b	0,32
128.1	2,00	1,92	Com aditivos	2,41 b	
129	4,00	3,84	Sem aditivos	4,88 c	0,28
129.1	4,00	3,84	Com aditivos	4,60 c	
130	6,00	5,76	Sem aditivos	5,99 d	0,08
130.1	6,00	5,76	Com aditivos	6,07 d	
131	8,00	7,68	Sem aditivos	8,27 e	0,21
131.1	8,00	7,68	Com aditivos	8,06 e	
132	10,00	9,60	Sem aditivos	10,37 f	0,20
132.1	10,00	9,60	Com aditivos	10,17 f	

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²%C₃ sem aditivo - %C₃ com aditivo

³letras em comum não diferem estatisticamente (Teste *t* para amostras pareadas, $\alpha < 0,05$)

6.5.9. Definição da equação mais precisa para a mensuração de fonte C₃ em refrigerante de maçã fabricados em laboratório

A participação de fonte C₃, em refrigerantes de maçã, pode ser quantificada utilizando duas equações: Equação 4 (diluição isotópica simples) e Equação 5 (diluição isotópica com fatores de correção). Na Equação 5, foi adotado o fator de correção

máximo ($A=0,91$) e o fator de correção mínimo ($A=0,84$) com base na participação dos açúcares da maçã na composição dos sólidos solúveis dos sucos concentrados (Tabela 10).

Para quantificar a participação de fonte C_3 em refrigerantes de maçã, foi adotado a média do valor isotópico do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado para refrigerante para a fonte C_3 ($\delta a = -27,58\text{‰}$ – Tabela 11), a média do valor isotópico do açúcar de cana ($\delta b = -12,72$ - Tabela 12) e o açúcar purificado extraído do refrigerante fabricado em laboratório em δp (Tabela 76).

A quantificação de fonte C_3 , utilizando a Equação 4, obteve os melhores resultados em todos os casos testados com exceção das amostras 104 e 108 (Tabela 83).

A comparação das equações também pode ser feita pela somatória dos erros. Dessa forma, a equação que teve os resultados práticos de fonte C_3 mais próximos dos resultados teóricos novamente foi a 4 (diluição isotópica simples) (Tabela 83).

Tabela 83. Comparação dos valores teóricos (balanço de sólidos solúveis) com os valores práticos de fonte C₃ calculados por meio das equações 4 e 5 em refrigerantes de maçã.

Nº	% Suco ¹	%C ₃ Teórica	Equação 4		Equação 5			
			%C ₃	Erro (%) ²	%C ₃ (0,91) ³	Erro (%)	%C ₃ (0,84) ³	Erro (%)
100	0,00	0,00	0,67	0,67	0,74	0,74	0,80	0,80
101	1,00	0,96	1,28	0,32	1,40	0,44	1,52	0,56
102	2,00	1,92	2,22	0,30	2,44	0,51	2,63	0,71
103	3,00	2,88	2,83	0,05	3,10	0,22	3,35	0,47
104	4,00	3,84	3,50	0,34	3,83	0,01	4,14	0,30
105	5,00	4,80	4,78	0,02	5,23	0,43	5,64	0,84
106	6,00	5,76	6,70	0,94	7,31	1,55	7,87	2,11
107	7,00	6,72	6,97	0,24	7,60	0,88	8,18	1,46
108	8,00	7,68	7,34	0,34	8,00	0,32	8,61	0,93
109	9,00	8,64	8,48	0,16	9,24	0,60	9,93	1,29
110	10,00	9,60	9,83	0,22	10,69	1,09	11,48	1,88
Somatória dos Erros				3,60		6,79		11,35

¹% de suco concentrado clarificado para refrigerante (amostra 18) adicionado a 10°Brix (V/V)

²%C₃ teórico - %C₃ prático

³fator de correção (A) mensurado com base na participação dos açúcares da maçã na composição do °Brix

negrito = resultados mais exatos em relação a % teórica de fonte C₃

A Equação 4 obteve resultados mais exatos para refrigerantes de maçã fabricados em laboratório. Portanto, esta equação foi a utilizada para calcular a participação de fonte C₃ nas amostras de refrigerantes de maçã comerciais.

6.5.10. Concepção do limite de legalidade para refrigerantes de maçã

Para determinar a legalidade dos refrigerantes comerciais, foi necessária a criação do limite de legalidade. O limite de legalidade fornece a concentração mínima de fonte C₃ que um suco clarificado de maçã deve apresentar para ser considerado legal, diante a legislação brasileira. Este cálculo foi empregado em refrigerantes de maçã com concentrações de sólidos solúveis finais em 10, 11, 12, 13, e 14°Brix adicionados de 5% (V/V) de suco clarificado de maçã para refrigerante (quantidade mínima de suco permitida pela legislação brasileira) a 10°Brix (Tabela 84).

Tabela 84. Balanço de massa para refrigerantes de maçã adicionados com 5% de suco de maçã clarificado para refrigerante (V/V).

Nº	% Suco Adicionado	°Brix Inicial do Suco	mL Suco	°Brix Açúcar	g ¹ Açúcar	°Brix Água	mL Água	°Brix Refrigerante	mL Refrigerante
168	5,00	10,00	12,50	100,00	24,70	0,00	222,31	10,00	250,00
169	5,00	10,00	12,50	100,00	27,41	0,00	220,63	11,00	250,00
170	5,00	10,00	12,50	100,00	30,15	0,00	218,94	12,00	250,00
171	5,00	10,00	12,50	100,00	32,91	0,00	217,24	13,00	250,00
172	5,00	10,00	12,50	100,00	35,69	0,00	215,52	14,00	250,00

¹gramas

A partir dos dados da Tabela 84, foi possível calcular, utilizando a Equação 6 (°Brix), a porcentagem mínima de sólidos solúveis dos sucos (fonte C₃), após a adição de 5% de suco clarificado para refrigerante a 10°Brix (V/V) nas amostras de refrigerantes (Tabela 85).

Tabela 85. Porcentagem mínima de sólidos solúveis procedentes de fonte C₃ em néctares de maçã com adição de 5% de suco clarificado de maçã para refrigerante (V/V).

Nº	°Brix Refrigerante	Massa de Sólidos Solúveis do Suco(g)	Massa de Sólidos Solúveis do Açúcar(g)	Massa de Sólidos Solúveis Totais (g)	%Sólidos Solúveis Suco (Fonte C ₃) Limite de Legalidade
168	10,00	1,30	24,70	26,00	5,00
169	11,00	1,30	27,41	28,71	4,53
170	12,00	1,30	30,15	31,45	4,13
171	13,00	1,30	32,91	34,21	3,80
172	14,00	1,30	35,69	36,99	3,51

Na Tabela 85 estão representados os valores do limite de legalidade para refrigerantes de maçã comerciais. Os valores da quantificação de fonte C₃ que estiverem acima do limite de legalidade foram considerados legais. Caso estes valores estejam abaixo deste limite, estes produtos foram considerados adulterados conforme a legislação brasileira para refrigerantes de maçã.

6.5.11. Análise isotópica e determinação da legalidade dos refrigerantes comerciais de maçã

De acordo com a Tabela 86, a variação no enriquecimento isotópico relativo foi de -14,25 a -13,12‰ nos refrigerantes comerciais e -14,24 a -13,18‰ para os açúcares purificados extraído destes refrigerantes.

Tabela 86. Enriquecimento isotópico relativo do carbono-13 em refrigerantes de maçã comerciais e na fração do açúcar purificado extraído destes refrigerantes.

Nº	Descrição	Refrigerante (‰)	D.M. ¹	Açúcar Purificado (‰)	D.M.
29	Refrigerante	-14,25	0,14	-14,24	0,01
32	Refrigerante	-13,24	0,09	-13,41	0,05
33	Refrigerante	-13,12	0,06	-13,18	0,05

¹desvio-médio

Para determinar a legalidade em refrigerantes de maçã comerciais, foram utilizados três valores isotópicos como padrões para δa e δb e o valor isotópico do açúcar purificado extraído dos refrigerantes comerciais em δp . Em δa (açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado de maçã para refrigerante – Tabela 11) foi empregado o valor de -27,76‰ (amostra 18) como padrão do valor isotópico mais leve, -27,41‰ (amostra 17) como padrão do valor isotópico mais pesado e -27,58‰ como padrão médio das amostras de suco concentrado clarificado (padrão para refrigerante). Em δb (açúcar de cana – Tabela 12) foi empregado o valor isotópico de -13,06‰ como padrão do valor isotópico mais leve, -12,51‰ como padrão do valor isotópico mais pesado e -12,72‰ como padrão médio das amostras de açúcares. Para δp foi utilizado o valor isotópico do açúcar purificado extraído dos refrigerantes comerciais (Tabela 86). O valor isotópico mais leve, o valor isotópico médio e o valor isotópico mais pesado para δa foi combinado, respectivamente, com o valor isotópico mais leve, o valor isotópico médio e o valor isotópico mais pesado para δb conforme as Tabelas 87, 88 e 89.

Tabela 87. Quantificação de fonte C₃ em refrigerantes de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico mais leve do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado de maçã para refrigerante em δa (-27,76‰), o valor isotópico mais leve do açúcar de cana em δb (-13,06‰) e o valor isotópico do açúcar purificado extraído dos refrigerantes comerciais em δp .

Nº	°Brix	Açúcar Purificado Suco Concentrado (δa) (‰)	Açúcar de Cana (δb) (‰)	Açúcar Purificado do Refrigerante Comercial (δp) (‰)	% C ₃
29	10,60	-27,76	-13,06	-14,24	8,03
32	12,10	-27,76	-13,06	-13,41	2,38
33	10,40	-27,76	-13,06	-13,18	0,82

Tabela 88. Quantificação de fonte C₃ em refrigerantes de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico médio do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado de maçã para refrigerante em δa (-27,58‰), o valor isotópico médio do açúcar de cana em δb (-12,72‰) e o valor isotópico do açúcar purificado extraído dos refrigerantes comerciais em δp .

Nº	°Brix	Açúcar Purificado Suco Concentrado (δa) (‰)	Açúcar de Cana (δb) (‰)	Açúcar Purificado do Refrigerante Comercial (δp) (‰)	% C ₃
29	10,60	-27,58	-12,72	-14,24	10,23
32	12,10	-27,58	-12,72	-13,41	4,64
33	10,40	-27,58	-12,72	-13,18	3,10

Tabela 89. Quantificação de fonte C₃ em refrigerantes de maçã comerciais quando combinado o valor isotópico mais pesado do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado de maçã para refrigerante em δa (-27,41‰), o valor isotópico mais pesado do açúcar de cana em δb (-12,51‰) e o valor isotópico do açúcar purificado extraído dos refrigerantes comerciais em δp .

Nº	°Brix	Açúcar Purificado Suco Concentrado (δa) (‰)	Açúcar de Cana (δb) (‰)	Açúcar Purificado do Refrigerante Comercial (δp) (‰)	% C ₃
29	10,60	-27,41	-12,51	-14,24	11,61
32	12,10	-27,41	-12,51	-13,41	6,04
33	10,40	-27,41	-12,51	-13,18	4,50

De acordo com as Tabelas 87 e 89, as quantidades de fonte C₃ calculada para as amostras 29, 32 e 33 variaram, respectivamente, de 8,03 a 11,61%, 2,38 a 6,04% e 0,82 a 4,50%. Portanto, a diferença entre a quantificação máxima e a mínima de fonte C₃ em refrigerantes de maçã comerciais não supera 3,68%. Sabendo que a porcentagem mínima de suco de maçã clarificado adicionado aos refrigerantes de maçã é de 5% (V/V), esta variação de até 3,68% pode ser considerada expressiva. Em suco clarificado de maçã comercial a diferença entre a quantificação máxima e a mínima de fonte C₃ foi de 3,57%. Portanto, a diferença entre quantificação máxima e a mínima de fonte C₃ obtida para as amostras de refrigerantes comerciais está de acordo com o esperado para produtos de maçã que não apresentam padrão interno (polpa).

Como já citado, refrigerantes de maçã devem conter, no mínimo, 5% de suco clarificado de maçã para refrigerante (V/V) (BRASIL, 1998). Além disso, este suco deve estar, no mínimo, a 10°Brix (BRASIL, 1998). Relacionando as quantidades de fonte C₃ ao °Brix dos refrigerantes comerciais, a amostra 29 está de acordo com a legislação brasileira. A amostra 32, dependendo do enriquecimento isotópico relativo das matérias-primas utilizadas na sua fabricação, pode ser classificada como legal ou adulterada. Assim, este refrigerante foi classificado em uma região de incerteza quando a mensuração da fonte C₃. Para a amostra 33, todas as combinações realizadas entre δa , δb e δp resultaram numa quantificação de fonte C₃ menor que o limite de legalidade calculado para refrigerantes de maçã comerciais. Dessa forma, a amostra 33 foi classificada como adulterada (Figura 4).

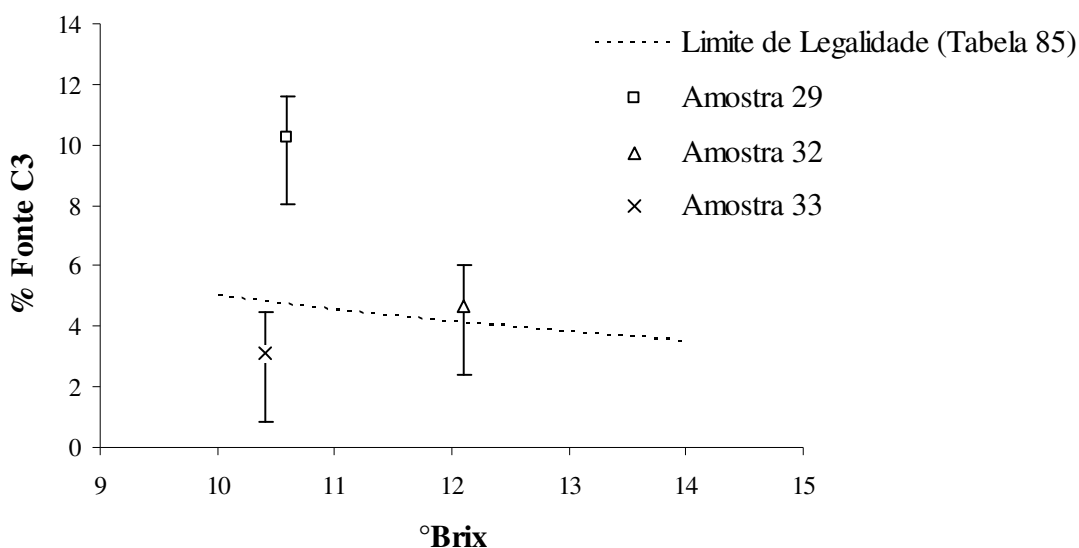


Figura 4. Relação entre a quantidade de fonte C₃ e o °Brix para classificar a legalidade dos refrigerantes de maçã comerciais.

6.5.12. Análises energéticas em refrigerantes de maçã comerciais

A composição centesimal dos refrigerantes de maçã comerciais esta representada na Tabela 90.

Tabela 90. Composição centesimal de refrigerantes de maçã comerciais.

N°	Produto	Carboidrato (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
29	Refrigerante	8,83	0,21	0,44	0,05	90,48
32	Refrigerante	6,41	0,28	0,73	0,07	92,51
33	Refrigerante	8,49	0,20	0,56	0,01	90,74

Com base nos dados da Tabela 90 e utilizando os fatores de correção propostos pela ANVISA (BRASIL, 1999), foi mensurado o cálculo centesimal para os refrigerantes de maçã comerciais (Tabela 91).

Na Tabela 91, o valor energético fornecido no rótulo dos refrigerantes de maçã comerciais foi comparado com o valor energético fornecido pelo cálculo centesimal e pela mensuração em bomba calorimétrica destes refrigerantes.

Conforme determinado pela ANVISA, para refrigerantes são considerados fora dos padrões de qualidade os valores dos rótulos dos produtos que não estiverem dentro do intervalo de tolerância de $\pm 20\%$ (BRASIL, 2003b). Dessa forma, comparando os valores energéticos do cálculo centesimal e bomba calorimétrica com os valores mencionados no rótulo dos refrigerantes, foi possível concluir que as amostras 29 e 33 estão de acordo com as normas de ANVISA. Na amostra 32, todos os métodos usados para a análise energética (cálculo centesimal e bomba calorimétrica) tiveram resultados superiores ao limite de $+20\%$. Dessa forma, a amostra 32 está fora do padrão determinado pela ANVISA (Tabela 91).

Tabela 91. Comparação entre o valor energético fornecido no rótulo dos refrigerantes de maçã comerciais e os valores estimados do cálculo centesimal e bomba calorimétrica.

Valores Referentes a 200mL de Refrigerante de Maçã Comercial											
N°	Produto	Rótulo		Limite $+20\%$ ¹		Limite -20% ¹		Cálculo		Bomba Calorimétrica	
		Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ	Kcal	KJ
29	Refrigerante	85,00	355,30	102,00	426,36	68,00	284,24	80,12	334,92	75,89	317,23
32	Refrigerante	41,00	171,38	49,20	205,66	32,80	137,10	66,71	278,87	73,56	307,48
33	Refrigerante	80,00	334,40	96,00	401,28	64,00	267,52	79,61	332,76	72,77	304,18

¹Limite de $\pm 20\%$ calculado sobre os valores informados nos rótulos dos produtos comerciais

7. PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES OBTIDAS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia de análise isotópica que permita mensurar a quantidade de carbono C_3 (produtos de maçã) em suco, néctar e refrigerante de maçã. Em função deste propósito foi possível concluir que:

7.1. Suco Clarificado de Maçã

Para quantificar a participação de fonte C_3 em sucos clarificados, recomenda-se utilizar a equação da diluição isotópica simples (Equação 4). Nesta equação, quando foi combinado o enriquecimento relativo do suco concentrado clarificado em δ_a , o enriquecimento relativo do açúcar de cana em δ_b e o enriquecimento relativo do suco clarificado em δ_p foram obtidos os resultados mais exatos para a quantificação de fonte C_3 (Tabela 92).

Na comparação entre sucos clarificados fabricados com aditivos e sucos clarificados fabricados sem aditivos não foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras (Teste t para amostras pareadas, $\alpha < 0,05$) (Tabela 92).

Todos os sucos clarificados de maçã comerciais informavam na embalagem a utilização do açúcar de cana na produção desta bebida.

A partir dos distintos valores isotópicos utilizados em δ_a , δ_b e δ_p foi possível determinar uma faixa de quantificação de fonte C_3 para cada suco clarificado de maçã comercial. Subtraindo a quantificação máxima de fonte C_3 pela quantificação mínima, esta diferença não supera 3,57% (Tabela 92). Este resultado pode ser considerado satisfatório sabendo que, em sucos clarificados de maçã, não há padrão interno (polpa). Dessa forma, a quantificação de fonte C_3 foi mensurada utilizando valores isotópicos para δ_a e δ_b obtidos do banco de dados para suco concentrado clarificado de maçã e do banco de dados para açúcar de cana.

7.1.1. Conclusão geral para suco clarificado de maçã

A metodologia desenvolvida nesta pesquisa para mensurar a quantidade de carbono C_3 em suco clarificado de maçã comercial provou ser eficiente para identificar as bebidas que estão em conformidade com a legislação brasileira.

7.2. Suco Polposo de Maçã

Para quantificar a participação de fonte C_3 em sucos polposos, recomenda-se utilizar a equação da diluição isotópica simples (Equação 4). Nesta equação, quando foi combinado o enriquecimento relativo da polpa lavada com acetona extraída do suco polposo em δ_a , o enriquecimento relativo do açúcar de cana em δ_b e o enriquecimento relativo do açúcar purificado extraído dos sucos polposos em δ_p foram obtidos os resultados mais exatos para a quantificação de C_3 (Tabela 92).

Na comparação entre sucos polposos fabricados com aditivos e sucos polposos fabricados sem aditivos não foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras (Teste t para amostras pareadas, $\alpha < 0,05$) (Tabela 92).

Todos os sucos polposos de maçã comerciais informavam na embalagem a denominação integral.

A partir dos distintos valores isotópicos utilizados em δ_a , δ_b e δ_p foi possível determinar uma faixa de quantificação de fonte C_3 para cada suco polposo de maçã comercial. Subtraindo a quantificação máxima de fonte C_3 pela quantificação mínima, esta diferença não supera 0,45% (Tabela 92). Esta pequena variação ocorreu pela utilização do padrão interno na quantificação da fonte C_3 . Além disso, como a concentração de fonte C_3 em

suco polposo integral se aproxima de 100%, o valor isotópico da fonte C₄ tem pouca influência na quantificação da fonte C₃ (Figura 5).

7.2.1. Conclusão geral para suco polposo de maçã

A metodologia desenvolvida nesta pesquisa para mensurar a quantidade de carbono C₃ em suco polposo de maçã comercial provou ser eficiente para identificar as bebidas que estão em conformidade com a legislação brasileira.

7.3. Néctar de Maçã

Para quantificar a participação de fonte C₃ em néctares de maçã, recomenda-se utilizar a equação da diluição isotópica simples (Equação 4). Nesta equação, quando foi combinado o enriquecimento relativo da polpa lavada com acetona extraída do néctar em δa , o enriquecimento relativo do açúcar de cana em δb e o enriquecimento relativo do açúcar purificado extraído do néctar em δp foram obtidos os resultados mais exatos para a quantificação de C₃ (Tabela 92).

Na comparação entre néctares fabricados com aditivos e néctares fabricados sem aditivos não foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras (Teste *t* para amostras pareadas, $\alpha < 0,05$) (Tabela 92).

A partir dos distintos valores isotópicos utilizados em δa , δb e δp foi possível determinar uma faixa de quantificação de fonte C₃ para cada néctar de maçã comercial. Subtraindo a quantificação máxima de fonte C₃ pela quantificação mínima, esta diferença não supera 2,54% (Tabela 92). Em néctares de maçã comerciais, a quantificação máxima e a mínima de fonte C₃ teve maior variação que a observada em sucos polposos comerciais (0,45%). Neste produto (suco polposo), a concentração de fonte C₃ se aproxima de 100% e, portanto, o valor isotópico da fonte C₄ tem pouca influência na quantificação da fonte C₃. Já para néctar de maçã a concentração de fonte C₃ varia em 26% (Figura 5). Logo, o valor isotópico da fonte C₄ influencia diretamente na quantificação da fonte C₃. Este fato contribui para que o néctar de maçã comercial tenha maior diferença entre a quantificação máxima e a quantificação mínima de fonte C₃ que a observada em sucos polposos de maçã comerciais.

7.3.1. Conclusão geral para néctar de maçã

A metodologia desenvolvida nesta pesquisa para mensurar a quantidade de carbono C_3 em néctar de maçã comercial provou ser eficiente para identificar as bebidas que estão em conformidade com a legislação brasileira.

7.4. Refrigerante de Maçã

Para quantificar a participação de fonte C_3 em refrigerante de maçã, recomenda-se utilizar a equação da diluição isotópica simples (Equação 4). Nesta equação, quando foi combinado o enriquecimento relativo do açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado (padrão para refrigerante) em δ_a , o enriquecimento relativo do açúcar de cana em δ_b e o enriquecimento relativo do açúcar purificado extraído do refrigerante em δ_p foram obtidos os resultados mais exatos para a quantificação de C_3 (Tabela 92).

Na comparação entre refrigerantes fabricados com aditivos e refrigerantes fabricados sem aditivos não foram observadas diferenças estatísticas entre as amostras (Teste t para amostras pareadas, $\alpha < 0,05$) (Tabela 92).

A partir dos distintos valores isotópicos utilizados em δ_a , δ_b e δ_p foi possível determinar uma faixa de quantificação de fonte C_3 para cada refrigerante de maçã comercial. Subtraindo a quantificação máxima de fonte C_3 pela quantificação mínima, esta diferença não supera 3,68% (Tabela 92). Esta variação está próxima da encontrada em sucos clarificados de maçã. Em ambos os casos não há padrão interno (polpa). Sabendo que a porcentagem mínima de suco de maçã clarificado adicionado aos refrigerantes de maçã é de 5% (V/V), esta variação de até 3,68% pode ser considerada expressiva. Em relação a refrigerante de maçã, diferentemente do que ocorre para sucos de maçã, o valor isotópico utilizado em δ_a tem pouca influencia na quantificação da fonte C_3 em função da baixa quantidade de suco de maçã adicionado na produção dos refrigerantes comerciais (Figura 5).

7.4.1. Conclusão geral para refrigerante de maçã

Mesmo com uma expressiva diferença entre a quantificação máxima e a mínima de fonte C_3 , a metodologia desenvolvida nesta pesquisa conseguiu identificar os refrigerantes de maçã que estão em conformidade com a legislação brasileira.

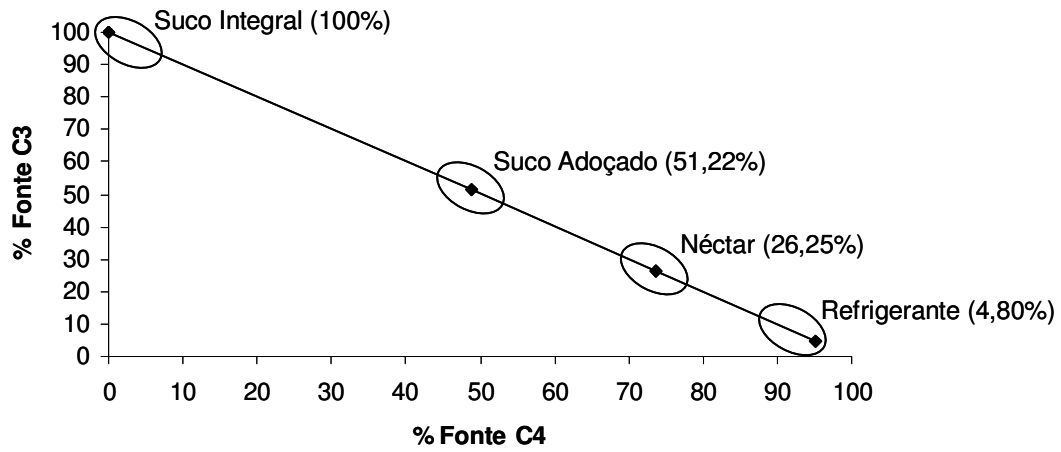
7.5. Conclusão Geral do Trabalho

A metodologia de análise isotópica desenvolvida neste trabalho foi eficiente para mensurar a quantidade de carbono C_3 em suco, néctar e refrigerante de maçã. Seguindo as etapas propostas neste trabalho, esta metodologia também pode ser aplicada em outras bebidas de frutas comerciais como instrumento de verificação da legalidade.

Tabela 92. Resumo dos principais resultados obtidos no desenvolvimento da metodologia de análise isotópica de quantificação de carbono C_3 em suco, néctar e refrigerante de maçã.

Bebidas de Maçã				
	Suco Clarificado	Suco Polposo	Néctar	Refrigerante
Presença de Polpa	Sem Polpa	Com Polpa	Com Polpa	Sem Polpa
Parâmetros de δa para quantificar a fonte C_3	Suco concentrado	Polpa lavada com acetona	Polpa lavada com acetona	Açúcar purificado extraído do suco concentrado clarificado
Parâmetros de δb para quantificar a fonte C_3	Açúcar de cana	Açúcar de cana	Açúcar de cana	Açúcar de cana
Parâmetros de δp para quantificar a fonte C_3	Suco clarificado	Açúcar purificado extraído do suco polposo	Açúcar purificado extraído do néctar	Açúcar purificado extraído do refrigerante
Comparação entre bebidas fabricadas sem aditivos e com aditivos ($\alpha < 0,05$)	Não há diferença estatística	Não há diferença estatística	Não há diferença estatística	Não há diferença estatística
Equação mais precisa para quantificar a fonte C_3	Diluição Isotópica Simples (Equação 4)	Diluição Isotópica Simples (Equação 4)	Diluição Isotópica Simples (Equação 4)	Diluição Isotópica Simples (Equação 4)
Diferença entre a quantificação máxima e a mínima de Fonte C_3 (%)	3,57	0,45	2,54	3,68
Legalidade das Bebidas Comerciais	Legal = 30 Adulterada = 31	Legal = 1 e 16 Adulterada = 28	Legal = 3, 7, 9, 12, 14 e 27	Legal = 29 Incerta = 32 Adulterada = 33

Figura 5. Relação entre a quantidade de fonte C₃ e C₄ observadas em suco, néctar e refrigerante de maçã.



8. REFERÊNCIAS

ANTOLOVICH, M.; LI, X.; ROBARDS, K. Detection of adulteration in Australian orange juices by stable carbon isotope ratio analysis (SCIRA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2623-2626, 2001.

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

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

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

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

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

_____. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S-I. **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. chap. 2, p. 47-82.

BRASIL. Lei n. 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 de setembro de 1990. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/leis/L8078.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto n. 2.314, de 4 de setembro de 1997. Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 de setembro de 1997. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1010>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto n. 3510, de 16 de junho de 2000. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto n. 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de junho de 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1012>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução Normativa n. 12, de 4 de setembro de 2003a. Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 de setembro de 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Regulamentos técnicos para fixação dos padrões de identidade e qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. Portaria n. 544, de 16 de novembro de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 de

novembro de 1998. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1150>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal. Portaria n. 44, de 31 de dezembro de 2001. Retifica a Portaria n. 39 de 5 de dezembro de 2001, estendendo o credenciamento do Laboratório do Centro de Isótopos Estáveis Ambientais em Ciência da Vida a realizar análises isotópicas da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ em bebidas em geral bem como emitir os respectivos certificados de análises. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 de janeiro de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n. 3.029, de 16 de abril de 1999. Aprova o Regulamento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. Brasília, DF, 19 de abril de 1999. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=16605&word=>>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília, DF, 2005. 1018 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Resolução-RDC n.360, de 23 de dezembro de 2003b. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de dezembro 2003. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word=RotulagemNutricionaIdeAlimentosEmbalados>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

BRAUN, G. World market(s) for apples juice concentrate 2003: missing apples?. **Fruit Processing**, Oberhonnefeld, v. 13, n. 6, p. 422-425, 2003.

BRICOUT, J.; KOZIET, J. Control of the authenticity of orange juice by isotopic analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 758-760, 1987.

CALORIMETRIA: física geral II: protocolos das aulas práticas, 2005/2006. Algarve: Universidade de Algarve. Disponível em: <<http://www.ualg.pt/fct/fisica/PDFdoc/Calorimetria.pdf#search=%22universidade%20de%20algarve%20caloria%22>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

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

COLL, J. B. et al. **Fisiologia vegetal**. Madri: Pirâmide, 1980. 750 p.

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

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

DENARDI, F.; CAMILO, A. P. Novas cultivares de macieira: proposta de nova composição de pomares com polinizadoras/produtoras. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, SC, v. 10, n. 2, p. 25-30, 1997.

DONER, L. W. et al. Detecting sugar-beet syrups in orange juice by D/H and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ analysis of sucrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 610-612, 1987.

DONER, L. W.; KRUEGER, H. W.; REESMAN, R. H., Isotopic composition of carbon in apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 362-364, 1980.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2005. 205 p. Apostila do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

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

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

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

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

FRITZ, P.; FONTES, J. C. Isotope and food. In: MARCEL, G. H. **Handbook of environmental isotope geochemistry**. Tokyo: Elsevier, 1986. chap. 12, v. 2, 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 Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p. 2645-2652, 1999.

GONZALEZ, J. et al. Authentication of lemon juices and concentrates by a combined multi-isotope approach using SNIF-NMR and IRMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2200-2205, 1998.

GONZALEZ, J. et al. Specific natural isotope profile studied by isotope ratio mass spectrometry (SNIF-IRMS): $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of fructose, glucose and sucrose for improved detection of sugar addition to pineapple juices and concentrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2316-2321, 1999.

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

HOUEROU, G.; KELLY, S. D.; DENNIS, M. J. Determination of oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of sugar, citric acid and water from single strength orange juice. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, p. 1257-1262, 1999.

JAMIN, E. et al. Detection of added L-Malic acid in apple juices: site specific ^{13}C – IRMS Method. **Fruit Processing**, v. 11, p. 434-436, 2000.

JAMIN, E. et al. Improved detection of sugar addition to apple juice and concentrates using internal standart ^{13}C IRMS. **Analytical Chimica Acta**, v. 347, p. 359-368, 1997.

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

KELLY, S. D. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In: LEES, M. **Food authenticity and traceability**. London: Woodhead, 2003. chap. 7, p. 156-183.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 960-972, 1999.

KOZIET, J.; ROSSMANN, A.; MARTIN, G. J. Determination of the ^{13}C contents of sugars of fruit and vegetables juices: inter-comparison study. **Analytica Chimica Acta**, v. 271, p. 31-38, 1993.

LEE, C. Y.; SMITH, N. L. Apples: an important source of antioxidants in the american diet. **New York Fruit Quartely**, v. 8, n. 2, p. 15-18, 2000.

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

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

MARMIROLI, N.; PEANO, C.; MAESTRI, E. Advanced PCR techniques in identifying food components. In: LEES, M. (Ed.) **Food authenticity and traceability**. London: Woodhead, 2003. chap. 1, p. 3-33.

OETTERER, M. **Alimentos: leis, definições e composições**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. Disponível em:
<<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/NormasAlimentos.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2006.

O'LEARY, M. H. Biochemical basis of carbon isotope fractionation. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. (Eds.). **Stable isotopes and plant carbon: water relations**. San Diego: Academic Press, 1993. chap.3, p. 19-28.

OLIVEIRA, A. C. B. Isótopos estáveis e produção de bebidas: de onde vem o carbono que consumimos? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, p. 285-288, 2002.

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

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

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

QUEIROZ, E. C. **Utilização dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio na detecção de adulteração e avaliação energética de bebidas de laranja**. 2005. 73 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura)–Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

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

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

ROSSMANN, A. et al. Determination of the carbon-13 content of sugars and pulp from fruit juices by isotope-ratio mass spectrometry (internal reference method). A European interlaboratory comparison. **Analytica Chimica Acta**, v. 340, p. 21-29, 1997.

SCHIMEL, D.S. **Theory and application of tracers**. San Diego: Academic Press, 1993. 119p.

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

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. **Nutrient database for standard reference**. Release 13. Washington, DC, 2008. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>. Acesso em: 21 mar. 2008.

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.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 3. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1980. 194 p.

VOGEL, J. C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. (Eds.). **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 29-46.

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

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.) **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 12, p. 255-291.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. Brazilian apples production: a few years later. **Fruit Processing**, Schönborn, v. 12, p. 472-475, 2002.

APÊNDICE

Tabela 93. Bebidas de maçã utilizadas neste trabalho.

Amostra	Descrição
1	Suco polposo de maçã integral comercial
3	Néctar de maçã comercial
7	Néctar de maçã comercial
9	Néctar de maçã comercial
12	Néctar de maçã comercial
14	Néctar de maçã comercial
16	Suco polposo de maçã integral comercial
17	Suco concentrado clarificado de maçã (padrão para refrigerante)
18	Suco concentrado clarificado de maçã (padrão para refrigerante)
19	Suco concentrado clarificado de maçã
20	Suco concentrado polposo de maçã
27	Néctar de maçã comercial
28	Suco polposo de maçã integral comercial
29	Refrigerante de maçã comercial
30	Suco clarificado de maçã adoçado comercial
31	Suco clarificado de maçã adoçado comercial
32	Refrigerante de maçã comercial
33	Refrigerante de maçã comercial
34	Suco concentrado clarificado de maçã
36	Suco concentrado polposo de maçã
37	Suco concentrado clarificado de maçã
38	Açúcar Cristal
38.1	Açúcar Cristal
38.2	Açúcar Cristal
38.3	Açúcar Cristal
38.4	Açúcar Cristal
38.5	Açúcar Cristal
38.6	Açúcar Refinado
38.7	Açúcar Refinado
38.8	Açúcar Refinado
38.9	Açúcar Líquido
38.10	Açúcar Líquido
38.11	Açúcar Líquido
38.12	Açúcar Líquido
38.13	Açúcar Líquido
38.14	Açúcar Invertido
38.15	Açúcar Invertido
38.16	Açúcar Invertido
38.17	Xarope de Caramelo
38.18	Açúcar Glacê
38.19	Açúcar Demerara
50	Suco clarificado de maçã fabricado com 0% de açúcar de cana

51	Suco clarificado de maçã fabricado com 2,5% de açúcar de cana
52	Suco clarificado de maçã fabricado com 5,0% de açúcar de cana
53	Suco clarificado de maçã fabricado com 7,5% de açúcar de cana
54	Suco clarificado de maçã fabricado com 10,0% de açúcar de cana
55	Suco clarificado de maçã fabricado com 12,5% de açúcar de cana
56	Suco clarificado de maçã fabricado com 15,0% de açúcar de cana
57	Suco clarificado de maçã fabricado com 17,5% de açúcar de cana
58	Suco clarificado de maçã fabricado com 20,0% de açúcar de cana
59	Suco polposo de maçã fabricado com 0% de açúcar de cana
60	Suco polposo de maçã fabricado com 2,5% de açúcar de cana
61	Suco polposo de maçã fabricado com 5,0% de açúcar de cana
62	Suco polposo de maçã fabricado com 7,5% de açúcar de cana
63	Suco polposo de maçã fabricado com 10,0% de açúcar de cana
64	Suco polposo de maçã fabricado com 12,5% de açúcar de cana
65	Suco polposo de maçã fabricado com 15,0% de açúcar de cana
66	Suco polposo de maçã fabricado com 17,5% de açúcar de cana
67	Suco polposo de maçã fabricado com 20,0% de açúcar de cana
80	Néctar de maçã fabricado com 0% de suco polposo
81	Néctar de maçã fabricado com 5% de suco polposo
82	Néctar de maçã fabricado com 10% de suco polposo
83	Néctar de maçã fabricado com 15% de suco polposo
84	Néctar de maçã fabricado com 20% de suco polposo
85	Néctar de maçã fabricado com 25% de suco polposo
86	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposo
87	Néctar de maçã fabricado com 35% de suco polposo
88	Néctar de maçã fabricado com 40% de suco polposo
89	Néctar de maçã fabricado com 45% de suco polposo
90	Néctar de maçã fabricado com 50% de suco polposo
91	Néctar de maçã fabricado com 55% de suco polposo
92	Néctar de maçã fabricado com 60% de suco polposo
93	Néctar de maçã fabricado com 65% de suco polposo
94	Néctar de maçã fabricado com 70% de suco polposo
95	Néctar de maçã fabricado com 75% de suco polposo
96	Néctar de maçã fabricado com 80% de suco polposo
100	Refrigerante de maçã fabricado com 0% de suco clarificado
101	Refrigerante de maçã fabricado com 1% de suco clarificado
102	Refrigerante de maçã fabricado com 2% de suco clarificado
103	Refrigerante de maçã fabricado com 3% de suco clarificado
104	Refrigerante de maçã fabricado com 4% de suco clarificado
105	Refrigerante de maçã fabricado com 5% de suco clarificado
106	Refrigerante de maçã fabricado com 6% de suco clarificado
107	Refrigerante de maçã fabricado com 7% de suco clarificado
108	Refrigerante de maçã fabricado com 8% de suco clarificado
109	Refrigerante de maçã fabricado com 9% de suco clarificado
110	Refrigerante de maçã fabricado com 10% de suco clarificado
111	Aroma de maçã

112	Ácido ascórbico
113	Goma xantana
114	Benzoato de sódio
115	Pectina
116	Ácido cítrico
117	Corante de caramelo
121	Néctar de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
121.1	Néctar de maçã fabricado em laboratório com aditivo
122	Néctar de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
122.1	Néctar de maçã fabricado em laboratório com aditivo
123	Néctar de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
123.1	Néctar de maçã fabricado em laboratório com aditivo
124	Néctar de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
124.1	Néctar de maçã fabricado em laboratório com aditivo
125	Néctar de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
125.1	Néctar de maçã fabricado em laboratório com aditivo
127	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
127.1	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório com aditivo
128	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
128.1	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório com aditivo
129	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
129.1	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório com aditivo
130	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
130.1	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório com aditivo
131	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
131.1	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório com aditivo
132	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
132.1	Refrigerante de maçã fabricado em laboratório com aditivo
133	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
133.1	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório com aditivo
134	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
134.1	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório com aditivo
135	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
135.1	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório com aditivo
136	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
136.1	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório com aditivo
137	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
137.1	Suco clarificado de maçã fabricado em laboratório com aditivo
142	Suco clarificado de maçã fabricado com 10,0% de açúcar de cana (teórico)
143	Suco clarificado de maçã fabricado com 10,0% de açúcar de cana (teórico)
144	Suco clarificado de maçã fabricado com 10,0% de açúcar de cana (teórico)
145	Suco clarificado de maçã fabricado com 10,0% de açúcar de cana (teórico)
146	Suco clarificado de maçã fabricado com 10,0% de açúcar de cana (teórico)
147	Suco clarificado de maçã fabricado com 10,0% de açúcar de cana (teórico)
156	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
157	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)

158	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
159	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
160	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
161	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
162	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
163	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
164	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
165	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
166	Néctar de maçã fabricado com 30% de suco polposos (teórico)
168	Refrigerante de maçã fabricado com 5% de suco clarificado (teórico)
169	Refrigerante de maçã fabricado com 5% de suco clarificado (teórico)
170	Refrigerante de maçã fabricado com 5% de suco clarificado (teórico)
171	Refrigerante de maçã fabricado com 5% de suco clarificado (teórico)
172	Refrigerante de maçã fabricado com 5% de suco clarificado (teórico)
175	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
175.1	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório com aditivo
176	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
176.1	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório com aditivo
177	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
177.1	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório com aditivo
178	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
178.1	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório com aditivo
179	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório sem aditivo
179.1	Suco polposos de maçã fabricado em laboratório com aditivo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)