

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E ENGENHARIAS
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

JULIA BAGGIO DEBIASI

AUTENTICIDADE E CONTROLE DE QUALIDADE DE SUCOS DE UVA
UTILIZANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H – METABOLÔMICA
APLICADA A AVALIAÇÃO DE ADULTERAÇÃO

CAXIAS DO SUL

2020

JULIA BAGGIO DEBIASI

**AUTENTICIDADE E CONTROLE DE QUALIDADE DE SUCOS DE UVA
UTILIZANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H – METABOLÔMICA
APLICADA A AVALIAÇÃO DE ADULTERAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Químico Bacharel pela Universidade de Caxias do Sul na Área do Conhecimento de Ciências Exatas e Engenharias.

Orientador Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Coordenadora Profa. Dra. Eliena Jonko

CAXIAS DO SUL

2020

JULIA BAGGIO DEBIASI

**AUTENTICIDADE E CONTROLE DE QUALIDADE DE SUCOS DE UVA
UTILIZANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H – METABOLÔMICA
APLICADA A AVALIAÇÃO DE ADULTERAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Químico Bacharel pela Universidade de Caxias do Sul na Área do Conhecimento de Ciências Exatas e Engenharias.

Aprovada em: 07/12/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Prof. Dr. Rogerio Vescia Lourega
Pontifícia Universidade Católica – PUC-RS

Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Spinelli
Laboratório de Referência Enológica – LAREN

AGRADECIMENTOS

Nenhuma conquista é alcançada sozinho, por isso, desejo de forma mais sincera e pura, agradecer a todos que de alguma maneira me direcionaram qualquer sentimento ou ato de apoio, força, positividade e coragem para que eu pudesse conquistar essa formação pessoal e acadêmica.

Aos meus amados pais, Ilda e Valdecir, meu coração transborda de orgulho e felicidade pelas oportunidades que vocês me proporcionaram. Meus maiores incentivadores, apoiadores das minhas ideias e escolhas, obrigada pelos sábios ensinamentos e pelo amor verdadeiro.

À minha grande e amada família e aos meus queridos amigos, eu agradeço pelas palavras de conforto e pelas boas energias que a mim foram concedidas para que mais essa etapa da minha vida fosse concluída com sucesso.

Por fim, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva pela oportunidade da realização desse estudo e a Luana Conte Crocoli pelo auxílio e conhecimento compartilhado.

*"Que sei eu do que serei, eu que não sei o que sou?
Ser o que penso? Mas penso ser tanta coisa!
E há tantos que pensam ser a mesma coisa
que não pode haver tantos!"*

Fernando Pessoa

RESUMO

A produção de sucos integrais prontos para consumo está em franca expansão, considerando que a alimentação saudável e a preocupação com a saúde e bem estar pessoal é uma tendência mundial. Dessa forma, estas bebidas tem se tornado alvo comum a adulteração, sendo necessário um maior controle destas ações. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido utilizada para controle de qualidade de alimentos, inclusive indicando possíveis fraudes, principalmente relacionada a aditivos intencionais em alimentos. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi a aplicação de análises por RMN ^1H para identificar possíveis fraudes alimentares em diferentes tipos de sucos de uva. Para isso foram testados padrões de glicose, frutose e sacarose, bem como 24 amostras reais adquiridas em mercados de Caxias do Sul. Para análises, as amostras foram preparadas através da diluição de 20 μL de amostra em 580 μL de água deuterada (D_2O) e, posteriormente, submetidas a análise de RMN ^1H . A partir dos espectros obtidos, detectamos etanol, ácido málico, tartárico e cítrico, além da frutose e glicose. Espectros obtidos para sucos integrais e néctar foram comparados a fim de verificar possível similaridade entre as composições. Com isso, foi possível verificar a presença de sacarose nas amostras de néctar, bem como em uma amostra indicada como suco integral (5A). Esse resultado indica uma possível fraude por adição de sacarose nesta amostra. Foi possível ainda, observar mudanças no deslocamento dos sinais característicos do ácido málico nas amostras de suco de maçã quando comparados com amostras de suco integral de uva. Isso pode ser explicado devido a mudança de pH da amostra (média de 2,85 para suco de uva e 3,96 para suco de maçã). Por fim, a análise quimiométrica por PCA foi aplicada a análise para auxiliar no entendimento das similaridades entre as amostras. Em resumo, este trabalho demonstra que análise de metabolitos por RMN, a qual é uma técnica robusta, com pouca ou nenhuma manipulação e preparação da amostra, é adequada para o estudo do controle de qualidade de sucos de uva.

Palavras-chave: suco de uva; adulteração; RMN; PCA.

ABSTRACT

The production of whole juices ready for consumption is booming, considering that the healthy eating and concern for health and personal well-being has become a worldwide trend. Thus, these drinks have become a common target for adulteration, requiring a better control of these actions. The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) has been used to control food quality, including to indicate possible fraud, mainly related to intentional additives in food. Based on this, the objective of this study was the application of ^1H NMR analysis to identify possible food fraud in different types of grape juices. In order to that, glucose, fructose and sucrose patterns were tested, as well as 24 real samples acquired in Caxias do Sul markets. For analysis, the samples were prepared by diluting 20 μL of sample in 580 μL of deuterated water (D_2O) and, subsequently submitted to ^1H NMR analysis. From the obtained spectra, we have detected ethanol, malic, tartaric and citric acid, in addition to fructose and glucose. Obtained spectra for whole and nectar juices were compared in order to verify possible similarity between compositions. Thus, it was possible to verify the presence of sucrose in nectar samples, as well as in a sample indicated as whole juice (5A). This result indicates a possible fraud caused by the addition of sucrose to this sample. Also, it was possible to observe changes in the displacement of the characteristics signals of malic acid in apple juice samples when compared with whole grape juice samples. It can be explained due to the change of pH from the sample (average of 2,85 for grape juice and 3.96 for apple juice). Finally, the PCA chemometric analysis was applied to help on understanding the similarities between the samples. In summary, this work demonstrates that metabolites analysis by NMR, which is a robust technique, with few or no sample manipulation and preparation, is suitable for the study of grape juices quality control.

Keywords: grape juice; adulteration; NMR; PCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Regiões brasileiras produtoras de uva.....	17
Figura 2 - Área cultivada com videiras no Brasil	18
Figura 3 - Evolução global da produção de uva	19
Figura 4 - Produção brasileira de uvas por estado.....	19
Figura 5 - Uva Isabel (V. labrusca).....	20
Figura 6 - Uva Concord (V. labrusca).....	21
Figura 7 - Uva Bordô (V. labrusca).....	22
Figura 8 - Estrutura química da glicose e frutose	23
Figura 9 - Estrutura química dos principais ácidos orgânicos presentes no suco de uva	24
Figura 10 - Estrutura química das antocianinas	24
Figura 11 - Estrutura química dos principais ácidos fenólicos presentes na maçã... ..	26
Figura 12 - Estrutura química dos principais flavonoides presentes na maçã	27
Figura 13 - Estrutura química da florizina e do sorbitol	30
Figura 14 - Representação dos estados de energia dos núcleos com spin $I = \frac{1}{2}$	31
Figura 15 - Diagrama de um espectro de RMN.....	32
Figura 16 - Esquema ilustrativo do tratamento quimiométrico aplicado aos dados de RMN.....	33
Figura 17 - Fluxograma de trabalho envolvido em análise metabolômica alvo.....	34
Figura 18 - Amostras de sucos.....	36
Figura 19 - Espectro obtido com 2 ns sem (A) e com (B) supressão do sinal da água	40
Figura 20 - Comparação e atribuição dos sinais dos espectros obtidos para os padrões de glicose, frutose e sacarose	41
Figura 21 - Gráficos com as características das amostras: tipo de formulação, sabor e embalagem.....	42
Figura 22 - Comparação entre espectros obtidos para amostra de néctar e suco integral.....	44
Figura 23 - Comparação do sinal do etanol (1,04 ppm) para os espectros de diferentes tipos de suco.....	45
Figura 24 - Identificação dos sinais dos ácidos tartárico, málico e cítrico e do aminoácido alanina em espectros de suco de uva integral	46

Figura 25 - Comparação dos espectros obtidos para amostras de suco integral	48
Figura 26 - Comparação de espectros de suco integral de maçã, uva e uva com maçã, evidenciando as mudanças de deslocamento químico e a ausência dos sinais de ácido málico na amostra de suco de maçã	49
Figura 27 - Resultado de PCA obtido para as amostras analisadas	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das amostras analisadas.....	41
Tabela 2 - Ingredientes rotulados em cada amostra	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	Código de Defesa do Consumidor
FID	<i>Free Induction Decay</i>
HCA	Análise do Componente Hierárquico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OIV	Organização Internacional do Vinho e da Vinha
PCA	Análise de Componentes Principais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV-VIS	Espectroscopia no Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO GERAL.....	15
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	A VIDEIRA.....	16
2.2	A UVA.....	18
2.2.1	Uva Isabel.....	20
2.2.2	Uva Concord.....	21
2.2.3	Uva Bordô.....	21
2.3	O SUCO DE UVA	22
2.4	O SUCO DE MAÇÃ	25
2.5	LEGISLAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE SUCO DE UVA	27
2.6	FRAUDE ALIMENTAR - ADULTERAÇÃO EM SUCO DE FRUTA	28
2.7	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	30
2.8	QUIMIOMETRIA.....	32
2.9	ANÁLISE METABOLÔMICA	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	AMOSTRAS	36
3.2	PREPARO DE AMOSTRA	36
3.3	ANÁLISE POR RMN.....	37
3.4	QUIMIOMETRIA.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	ANÁLISE POR RMN.....	39
4.1.1	Supressão do sinal da água	39
4.1.2	Análise de padrões	40
4.2	AMOSTRAS REAIS.....	41
4.2.1	Atribuições dos sinais de RMN de ¹ H.....	44
4.2.2	Adulteração.....	47
4.3	ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA (PCA)	50
5	CONCLUSÃO	53

6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Conforme as leis e as normas estabelecidas no Código de Defesa do Consumidor (CDC), "produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, fraudados, nocivos à vida ou à saúde, em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação..." (SENADO FEDERAL, 2017) são definidos como alimentos impróprios ao uso e consumo. Neste sentido, a fraude alimentar abrange atos intencionais fraudulentos e irresponsáveis relacionados com a qualidade de alimentos além de menções enganosas em rótulos e embalagens, as quais são ações que geralmente visam ganho econômico. Estas ações fraudulentas podem conduzir a consequências, como por exemplo, a adição e/ou dar condições a formação de compostos tóxicos que podem provocar sérias consequências para aos consumidores e empresas.

Nos dias atuais, a crescente busca por produtos que apresentam características nutricionais saudáveis e que possam prevenir e controlar doenças é um indicativo de que a população está cada vez mais preocupada com a saúde e bem-estar pessoal. Com o mesmo pensamento, os órgãos governamentais responsáveis pelo controle de qualidade dos alimentos, tem buscado regulamentar bem como apresentar as informações aos consumidores, sendo estas cada vez mais buscadas pelos consumidores ainda mais em tempos da rápida comunicação on-line (*Euromonitor International*, 2020).

O mercado brasileiro de sucos e néctares prontos para consumo apresenta um crescente aumento, acompanhando a tendência mundial da procura por bebidas que sejam saudáveis e saborosas (PIRILLO; SABIO, 2009). Dessa forma, esses alimentos tem sido alvos comuns e susceptíveis a adulteração. Entre os tipos mais comuns de fraude alimentar destacam-se a adição de água ou xarope, corantes e/ou flavorizantes, acidificação, bem como adição ou substituição de sucos provenientes de frutas de menor custo e adição (FIGUERA, 2010).

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido utilizada para detectar possíveis fraudes alimentares (SOBOLEV, et al.; 2019). Para isso, é usada identificação de perfil metabólico dos alimentos associado a análises estatísticas como PCA (Análise de Componentes Principais) e HCA (Análise do Componente Hierárquico). Ambas PCA e HCA são metodologias exploratórias, podendo revelar a similaridades ou possíveis diferenças entre amostras em um determinado conjunto de

dados. Dessa forma, a utilização destas técnicas representa significativa importância possibilitando avaliar e tratar grande quantidade de dados gerados por equipamentos analíticos de alta complexidade como o RMN, por exemplo (O'DONNELL *et al.*, 2014). Por fim, RMN de ^1H e ^{13}C tem sido a técnica mais amplamente utilizada para controle de qualidade de alimentos (LI, *et al.* 2020). Assim, este trabalho busca o desenvolvimento de um método por RMN de ^1H associado a análise estatística para avaliar possíveis fraudes por adição de sucos de outras frutas em sucos de uvas integrais.

1.1 OBJETIVO GERAL

Aplicação de análises por RMN ^1H para identificar possíveis fraudes em sucos de uva.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e comparar os espectros de RMN de ^1H obtidos para as amostras de suco de uva e maçã comerciais e caseiros;
- comparar os compostos (frutose, glicose, sacarose, etanol, ácido málico, tartárico e cítrico) identificados nos espectros com os compostos informados no rótulo do produto;
- avaliar a presença de possíveis compostos orgânicos não característicos e/ou não permitidos de sucos de uva;
- avaliar estatisticamente via Análise do Componente Principal (PCA – *Principal Component Analysis*) os resultados, identificando possíveis fraudes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A VIDEIRA

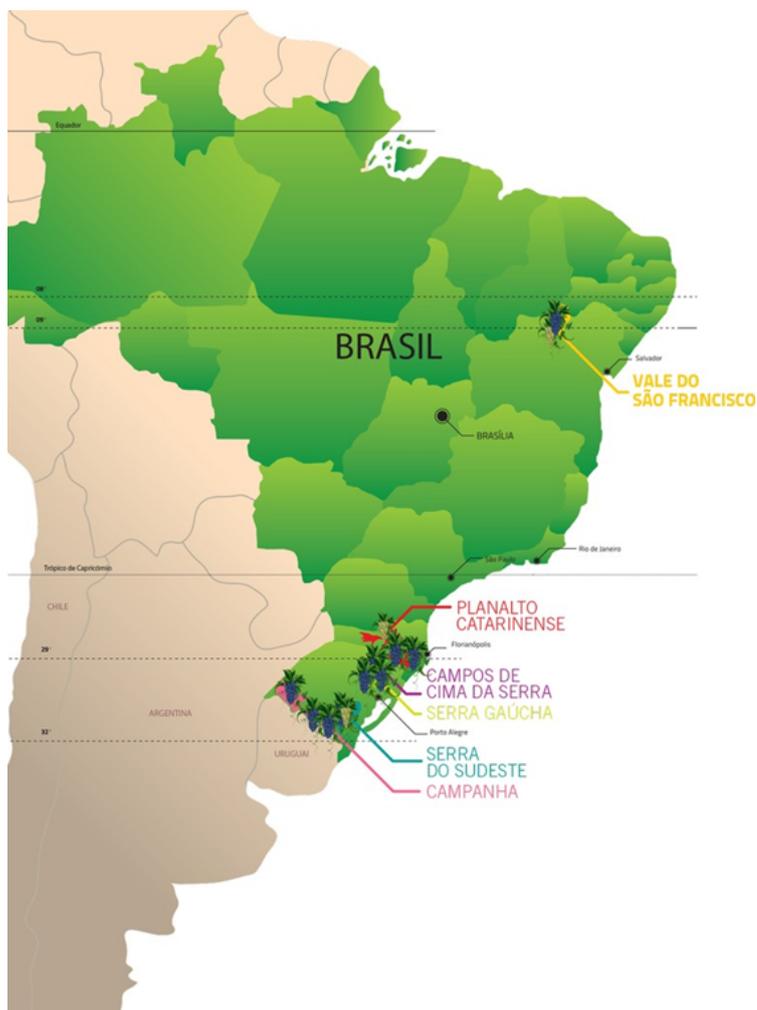
A espécie de videira *Vitis* que pertence à família *Vitaceae*, é cultivada há milhares de séculos, desde os tempos históricos do período neolítico no antigo Egito e na Ásia Menor. A principal origem da videira é denominada região do Cáucaso (entre o Mar Cáspio e o Mar Negro), no continente Asiático, de onde provém a espécie mais importante cultivada no mundo, a *Vitis vinifera*. No entanto, algumas espécies são originárias do continente americano e outras do continente asiático (BARBOSA et al., 2016). As sementes mais antigas foram encontradas nos sítios arqueológicos da Geórgia na Rússia e envolve um tipo de transição entre a forma selvagem pertencente à subespécie *V. vinifera ssp. sylvestris* e a subespécie *V. vinifera ssp. sativa L.*, (JOHNSON, 1989).

No Brasil, partindo de dados históricos, a cultura da uva teve início em 1532, quando colonizadores portugueses introduziram a videira de espécie *V. vinifera* na antiga Capitania de São Vicente, sendo atualmente denominado como Estado de São Paulo. A partir desse momento e no decorrer de introduções posteriores, a viticultura acabou por se expandir para outras regiões do país, sempre com cultivares de *Vitis vinifera* sendo procedentes de países como Portugal e Espanha até o século XIX (BOTELHO; PIRES, 2009).

Atualmente, a videira é uma das espécies frutíferas mais importantes no Brasil. Com diversas variedades cultivadas, se pode destacar a Isabel (híbrido de *V. vinifera* e *V. labrusca L.*), Concord, Niágara branca e Bordô (do tipo *V. labrusca L.*), além de outras bastante usadas para o consumo *in natura* e também na produção de sucos e vinhos por conta da sua capacidade de resistência a pragas e armazenar carboidratos (SANTANA, 2018).

A viticultura brasileira está concentrada principalmente nos estados das Regiões Sul e Sudeste. Entretanto, mais recentemente, a viticultura tem se desenvolvido muito em regiões mais quentes, principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Pernambuco, onde a chamada viticultura tropical irrigada vem ganhando cada vez mais importância no cenário da fruticultura brasileira de mesa (Figura 1) (MELO, 2018).

Figura 1- Regiões brasileiras produtoras de uva

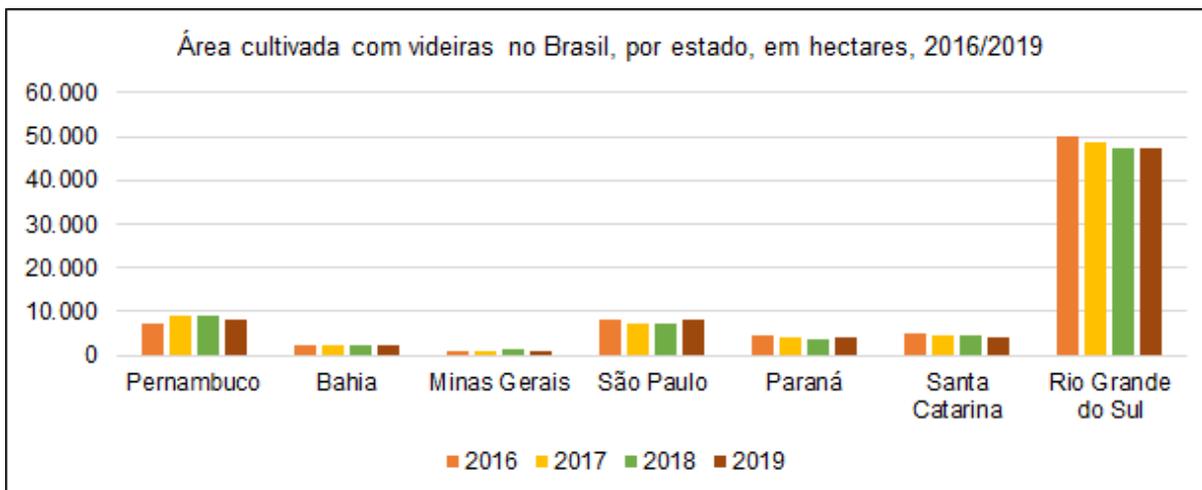


Fonte: Revista Adegas (2020)

No Brasil, a área plantada com videiras em 2019 foi de 75.731 ha, 0,33% superior à verificada no ano anterior, segundo dados obtidos no IBGE (IBGE, 2020). As regiões Sul e Sudeste representam grande parte desse valor como pode ser observado na Figura 2. Na primeira, em 2019, a área cultivada foi de 55.501 ha, representando 73,29% da área vitícola do país. Nessa região, o Rio Grande do Sul possui os maiores valores de área plantada (47.502,00 ha) correspondendo por 62,72% da área vitícola nacional, e apresentou aumento de 0,25%, comparado ao ano anterior.

A região Sudeste, por sua vez, tem área ocupada de 9.514 ha, representando 12,56% da área vitícola do país no mesmo ano. Nessa região ocorreu aumento na área com videiras, em 9,14%. O estado de São Paulo, grande produtor nacional de uva de mesa, com 8.164 ha de área, apresentou aumento de 12,87%.

Figura 2 - Área cultivada com videiras no Brasil

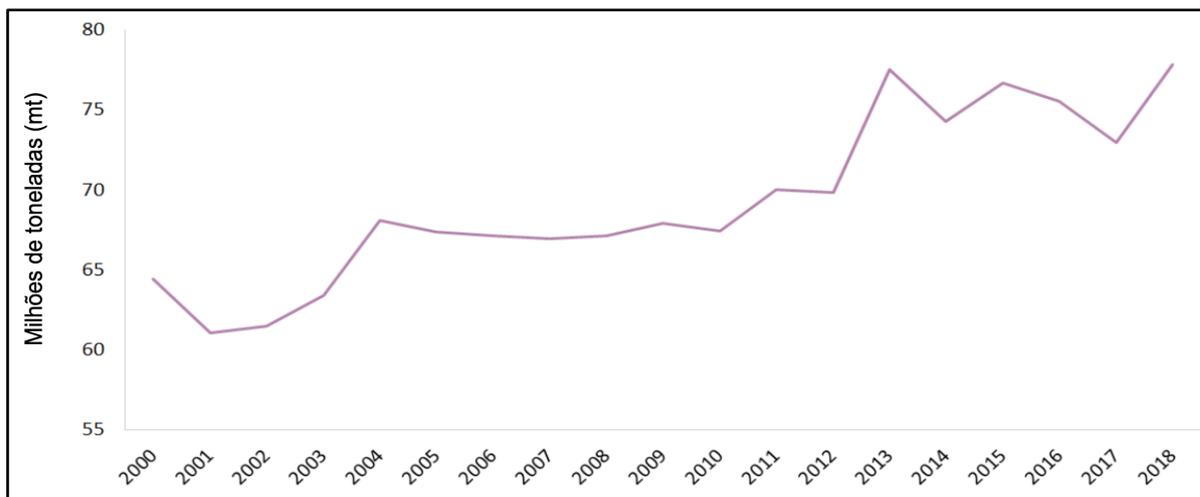


Fonte: Adaptado de IBGE (2020).

2.2 A UVA

Considerada como a fruta de cultivo mais antiga de que se tem conhecimento, a uva pertence ao gênero *Vitis*, único gênero da família *Vitaceae* com importância econômica (MIELE et al., 2008). Essa popularidade se destaca devido ao seu típico e bastante conhecido produto, o vinho, que faz da uva uma das frutas de maior produção mundial. Segundo dados coletados da Organização Internacional do Vinho e da Vinha (do inglês, *International Organisation of Vine and Wine*), no ano de 2018 a produção mundial de uvas somou um total de 77,8 milhões de toneladas. Os países que se destacaram foram China, Itália e Estados Unidos, respectivamente, sendo o Brasil classificado como o 15º país na escala de produção mundial de uva, somando, em 2019, um total de 1.445.705 t (toneladas), 9,20% inferior à produzida em 2018. Com base nesses dados a OIV informa que, 57% foram destinadas para a fabricação de vinho, 36% para o consumo da uva de mesa e 7% de uva seca. A Figura 3 a seguir, representa graficamente a evolução global da produção de uva.

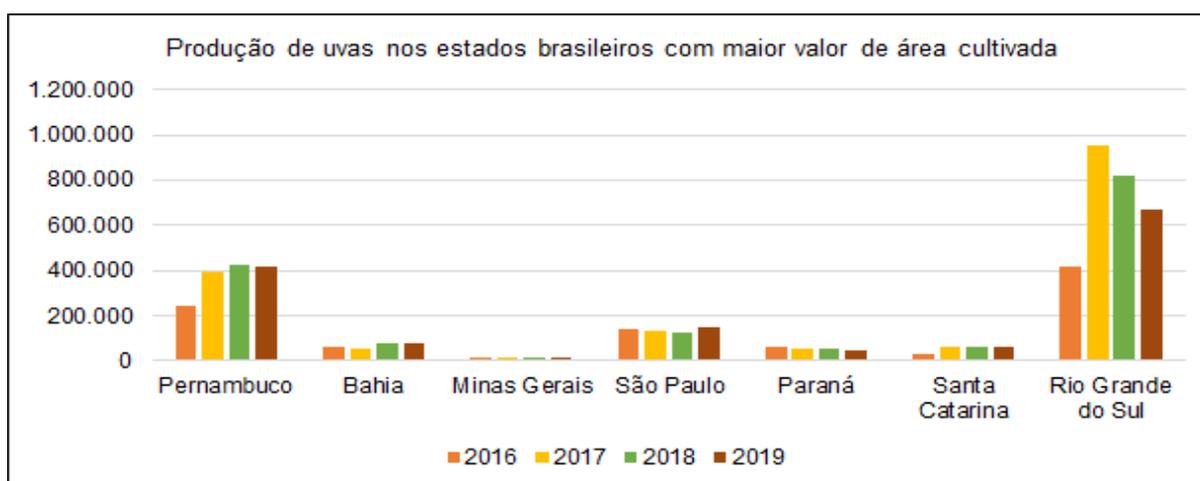
Figura 3 - Evolução global da produção de uva



Fonte: *International Organisation of Vine and Wine* (2018).

No Brasil, a região Sul é a maior produtora de uvas, sendo que em 2019 representou 53,53% da produção nacional. Ao contrário do ranking de área plantada, cujo segundo lugar é ocupado por São Paulo, o segundo maior produtor de uvas é o estado de Pernambuco, representando a região Nordeste, que contribuiu com 34,46% da produção nacional (Figura 4).

Figura 4 - Produção brasileira de uvas por estado



Fonte: Adaptado de IBGE (2020).

A uva e os seus derivados são alimentos bastante apreciados pela população de modo geral, devido ao fato de que o gênero inclui espécies e variedades para consumo como a fruta fresca para o consumo in natura ou seca (uva passa), suco, destilados (brandy, graspa), geleia e entre outros (MIELE et al., 2008).

As variedades de uva que são destinadas para a fabricação de suco devem apresentar bom rendimento em mosto, adequada relação doçura/acidez, bom nível de maturação e sanidade, além de possuir agradável sabor (BRESOLIN et al., 2013). No Brasil, as cultivares americanas Isabel, Concord e Bordô, pertencentes à espécie *Vitis labrusca*, são as variedades de uva tradicionalmente mais utilizadas para a elaboração de sucos. Isso se deve ao fato de fornecerem matéria-prima ideal para a produção de sucos, uma vez que essas uvas não perdem características aromáticas e gustativas depois do processamento industrial, além de serem mais produtivas e resistentes às doenças (CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005; GIOVANNINI, 2008).

2.2.1 Uva Isabel

A uva Isabel (Figura 5) é uma das mais importantes variedades pertencentes ao grupo das uvas americanas de espécie *V. labrusca* e participa com aproximadamente 45% da quantidade total de uvas que são produzidas no estado do Rio Grande do Sul, representando a região vitícola mais importante do Brasil. O seu predomínio assim como a sua expansão, são providos da facilidade de adaptação às diferentes condições ambientais e à qualidade da uva, originando alimentos com tipicidade e boa aceitação no mercado (CAMARGO, 2004).

Quando comparada com outras cultivares do seu grupo, a uva Isabel se destaca devido ao elevado conteúdo de açúcar na baga (grau Brix entre 14 e 18), o qual pode variar em função das safras (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Figura 5 - Uva Isabel (*V. labrusca*)



Fonte: Embrapa (2016).

2.2.2 Uva Concord

Difundida nos Estados Unidos, a uva Concord (Figura 6) também é conhecida como Bergerac, Francesa e Francesa Preta. Na Serra Gaúcha, a cultivar origina o suco mais buscado pelo consumidor, pois são mantidas suas características da uva fresca durante as etapas de processamento, além de propiciar melhor preço de comercialização (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Além do suco ser uma referência de aroma e sabor, essa variedade também é consumida como uva de mesa e destinada para a produção de vinho. Com a presença de uma acidez relativamente baixa, o teor de açúcar do mosto varia entre 14 °Brix e 16 °Brix.

Essa uva possui dificuldade de adaptação em regiões tropicais e, por isso, é geralmente cultivada em regiões onde ocorre a hibernação da videira. É relativamente precoce, medianamente vigorosa e bastante produtiva quando bem manejada (MAIA; CAMARGO, 2005).

Figura 6 - Uva Concord (*V. labrusca*)



Fonte: Embrapa (2016).

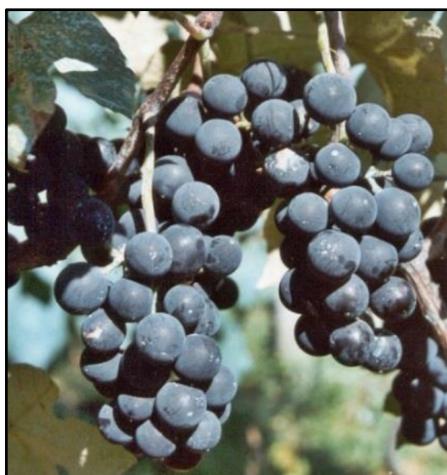
2.2.3 Uva Bordô

Selecionada nos Estados Unidos, a cultivar Bordô (Figura 7) tem como nome original Ives ou Ives Seedling, porém também é conhecida como Bordô, Terci e Folha de figo. Apresenta como principal característica uma alta resistência às doenças fúngicas e possui boa produtividade. É bastante demandada com uma quantidade de

32.000 toneladas para elaboração de vinho tinto, suco, vinagre, geleias e, por sua precocidade, é consumida in natura (RIZZON et al., 2000).

Apresenta um teor de açúcar do mosto que varia entre 13 a 16 °Brix e uma acidez consideravelmente baixa, sendo esta cultivar destacada, principalmente, devido a presença de um elevado conteúdo de matéria corante, pois permite a elaboração de sucos e vinhos com uma agradável intensidade de cor (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Figura 7 - Uva Bordô (*V. labrusca*)



Fonte: Valtair Comachio (2016).

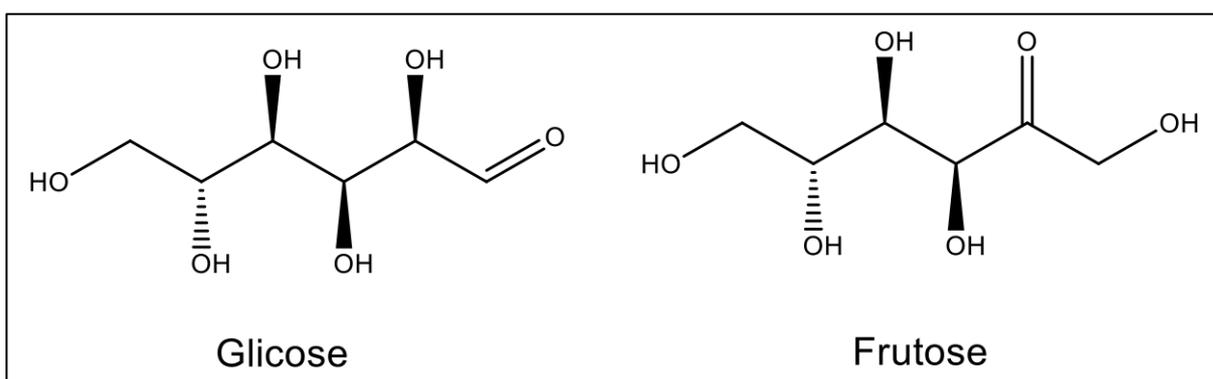
2.3 O SUCO DE UVA

MIELE (2008), define o suco de uva como uma bebida líquida límpida ou turva obtida através de um processo tecnológico adequado, não fermentado, não alcoólico e submetido a tratamento que assegure sua apresentação e sua conservação até o momento do consumo, ou seja, é indispensável manter as características aromáticas e gustativas durante seu processamento. Sendo a água o principal componente de sucos de frutas, o suco de uva pode ser um produto aliado para uma dieta alimentar devido ao seu valor nutricional, além das suas características organolépticas de cor, odor e sabor. Nutricionalmente, o suco pode ser comparado com a própria uva (RIZZON; MENEGUZZO, 2007), pois em sua composição são identificados todos os constituintes principais, tais como: açúcares (glicose e frutose), minerais (potássio, cálcio, ferro, cobre, entre outros), ácidos, vitaminas e compostos fenólicos que, além de responsáveis por sua cor, adstringência e estrutura, são benéficos à saúde.

Tecchio e seus colaboradores (2007), consideram as relações sólidos solúveis/acidez total, frutose/glicose, além dos teores combinados de taninos, ácidos totais, ésteres voláteis totais, antranilato de metila, potássio e cor a 520nm como elementos de qualificação para a obtenção de um suco de uva de qualidade. Os açúcares e ácidos orgânicos que são encontrados na bebida também são contribuintes para a qualidade sensorial do produto, pois conferem um pH mais baixo para o suco e asseguram um equilíbrio entre os sabores doce e ácido, o que resulta em um sabor agradável (GURAK et al, 2010).

Grande parte dos açúcares são encontrados nas folhas e, posteriormente são convertidos em frutose e glicose nas bagas (Figura 8). Além destes, outros compostos também são encontrados na fruta, tais como rafinose, estaquiose, maltose e galactose, porém, estes não afetam as características sensoriais da uva (GIOVANNINI, 2008).

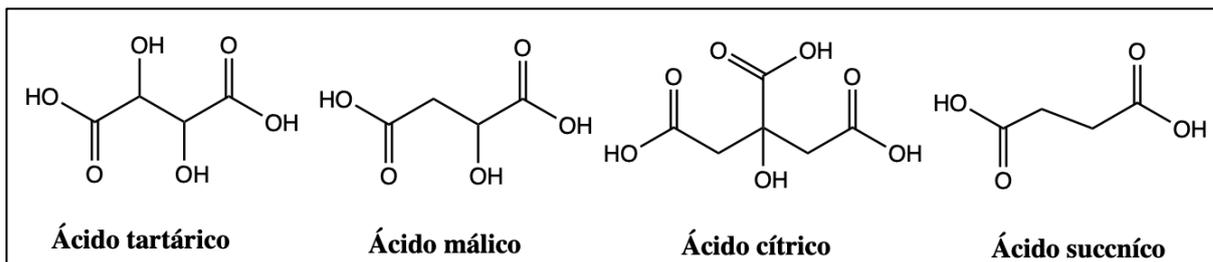
Figura 8 - Estrutura química da glicose e frutose



Fonte: PubChem.

Os ácidos característicos das uvas são formados nas bagas, quando estão verdes, e nas folhas. Até o estágio da maturação estes compostos apresentam uma maior concentração, quando comparadas à etapa de formação, com o amadurecimento ocorre uma redução do acúmulo destes ácidos. A redução da acidez total acontece devido à decomposição do ácido málico, por consequência de mudanças climáticas (GIOVANNINI, 2008). A Figura 9 a seguir representa os principais ácidos orgânicos predominantes no suco de uva, sendo estes os ácidos tartárico e málico, enquanto que os ácidos cítrico e succínico estão presentes em menores proporções (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2005).

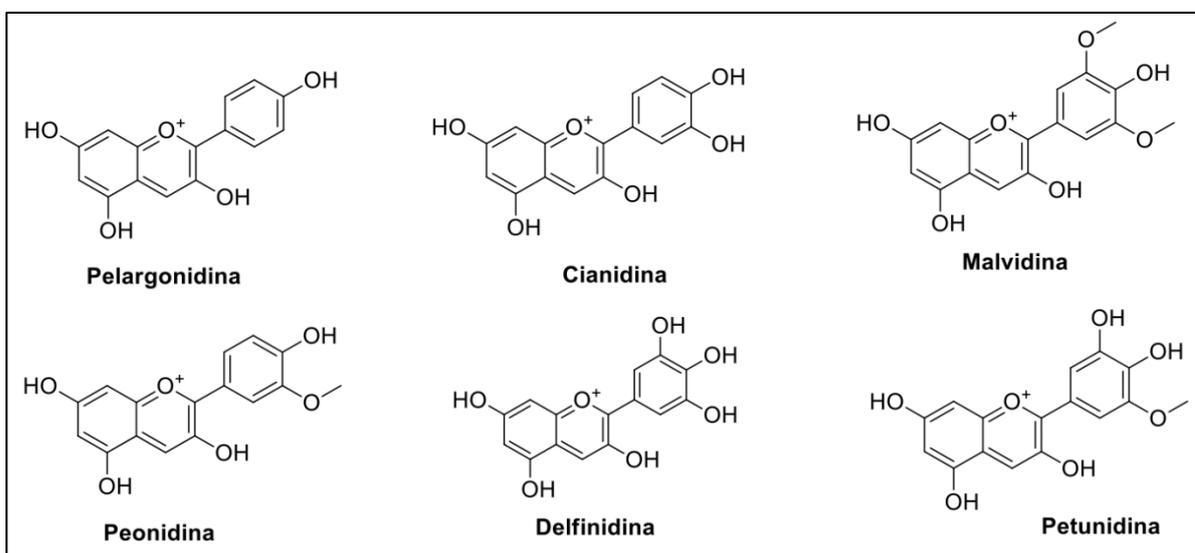
Figura 9 - Estrutura química dos principais ácidos orgânicos presentes no suco de uva



Fonte: Adaptado de Henrique (2015).

O suco de uva é considerado uma importante fonte de compostos fenólicos. Os que mais se destacam são os flavonoides (antocianinas, flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzoicos), além de uma ampla variedade de taninos (FRANCIS, 2000). Estes compostos possuem ação bactericida, antivírus e anti-aterosclerose, sendo assim bastante importantes para a qualidade final da uva. A Figura 10 a seguir apresenta a estrutura química de cinco antocianinas encontradas na videira.

Figura 10 - Estrutura química das antocianinas



Fonte: PubChem.

Os conteúdos de fenólicos totais e antocianinas nas uvas podem variar de acordo com a espécie, variedade, maturidade, condições climáticas e cultivar (MAZZA, 1995; SHAHIDI, 1995), além de determinados processos aos quais a uva e

o mosto são submetidos durante a fabricação do suco, podendo o produto final ser interferido por estes compostos.

2.4 O SUCO DE MAÇÃ

A maçã, fruta originária da macieira (*Malus ssp.*) pertencente à família *Rosaceae* e originária da Europa e Ásia, teve seu cultivo iniciado no Brasil no ano de 1960, no estado de Santa Catarina. Atualmente o cultivo da maçã, no Brasil, se concentra na Região Sul, sendo Santa Catarina o maior estado produtor, com aproximadamente 51% do total da área plantada e o Rio Grande do Sul como segundo estado, com 40% (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005). A Associação Brasileira dos Produtores de Maçã (ABPM, 2016) informa que, a maçã ocupa a terceira posição quando se trata das frutas mais consumidas no país, atrás apenas da laranja e banana.

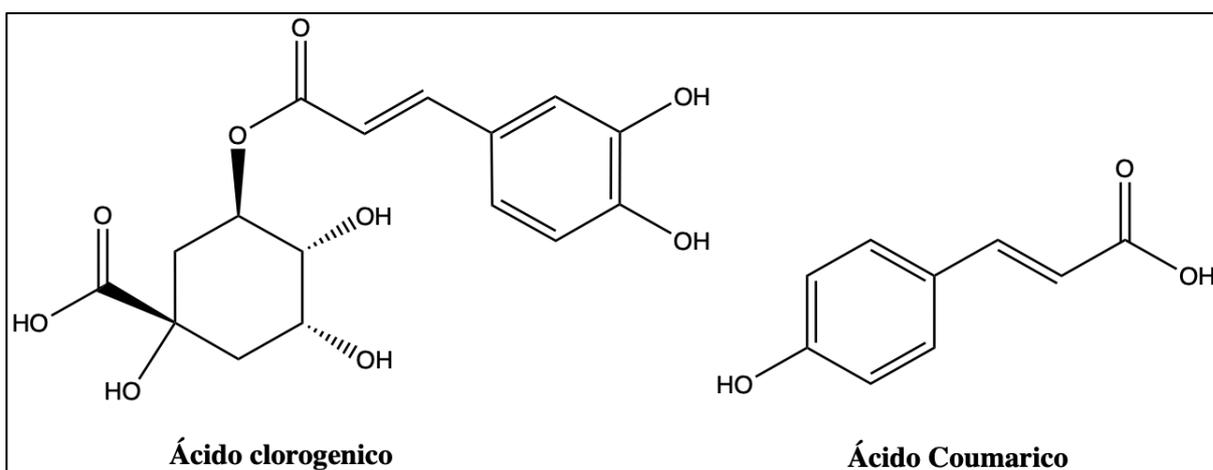
No Brasil, as cultivares mais produzidas são 'Gala' e 'Fuji' e, em conjunto, representam aproximadamente 90% da produção brasileira de maçãs (KOVALESKI et al, 2013). Além dessas, outras variedades são bastante comuns como a Eva, Condessa, Imperatriz, Baronesa, Daiane, Joaquina e Cripps Pink (Pink Lady).

Com a presença de compostos bioativos, a fruta in natura assim como o suco de maçã, são alimentos que contém propriedades benéficas, os quais desempenham um papel fundamental para a saúde humana, atuando na prevenção e controle de doenças cardiovasculares, pulmonares, diabetes, alergias, obesidade, atividade carcinogênica e entre outros (BOYER E LIU, 2004; SHAHIDI, 2012). Considerando as frutas de clima temperado cultivadas no Brasil, a maçã vem apresentando uma grande expansão na sua produção nas últimas décadas. É destinada principalmente para consumo in natura, porém, grande quantidade é processada e utilizada como matéria-prima para a fabricação de sucos e outros derivados como sidra, vinagre, geleia, destilados e entre outros produtos (KOVALESKI et al, 2013). Citado por Paganini (2004), alguns frutos da maçã apresentam características que as tornam sem valor comercial como: formato desuniforme, tamanho pequeno, coloração desuniforme, cicatrizes provenientes de insetos ou ferimentos resultantes de tratamentos culturais e transportes inadequados, assim como sintomas de doenças (manchas de sarna e de

podridões) e problemas fisiológicos. Apesar disso, esses fatores não alteram a composição química da fruta e, geralmente, são utilizadas como matéria-prima.

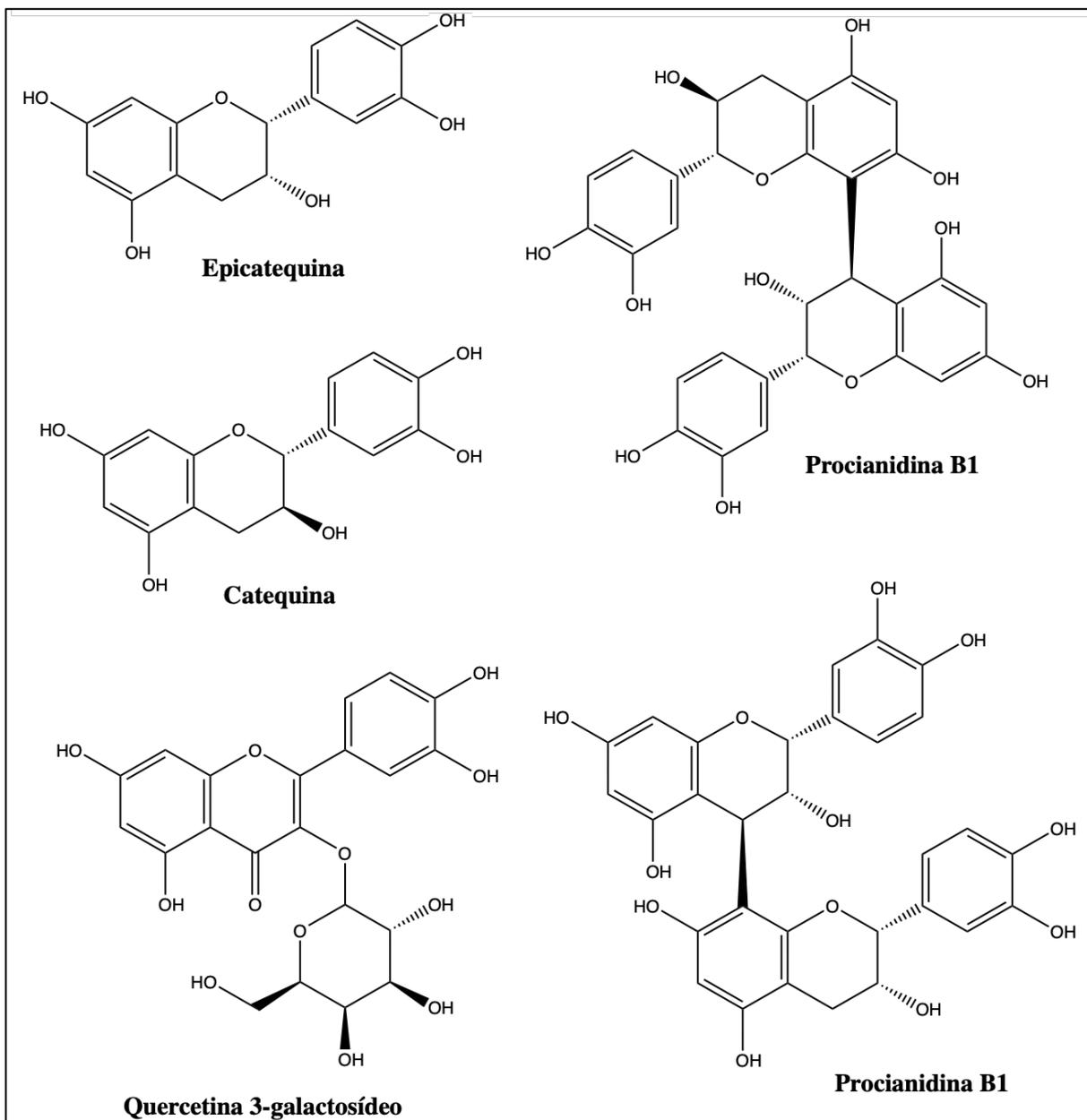
De acordo com Zandoná (2017), os frutos da macieira são bastante apreciados e consumidos devido às características sensoriais de aparência, textura, sabor e aroma, além das consideráveis quantidades de compostos fitoquímicos, como os compostos fenólicos (principais responsáveis pela atividade antioxidante), flavonoides e flavonóis. Os principais compostos fenólicos presentes na maçã são o ácido clorogênico e ácido cumárico (Figura 11). Já os flavonóides, representados na Figura 12, são procianidina, catequina, epicatequina, quercetina, além de antocianinas como a cianidina. A composição de compostos fenólicos em sucos de maçãs e sidras depende da variedade da maçã, do seu grau de maturação, das condições culturais e do tipo de extração durante a operação de prensagem (LEA; ARNOLD, 1978).

Figura 11 - Estrutura química dos principais ácidos fenólicos presentes na maçã



Fonte: Adaptado de Benvenuti (2018).

Figura 12 - Estrutura química dos principais flavonoides presentes na maçã



Fonte: Adaptado de Benvenuti (2018).

2.5 LEGISLAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE SUCO DE UVA

No Brasil, a legislação para a área de alimentos é regida pelo Ministério da Saúde, por intermédio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os sucos devem seguir as normas estabelecidas pela legislação específica, respeitando a definição,

classificação, registro, padronização e requisitos de qualidade, devendo também atender à legislação sobre a rotulagem de alimentos embalados.

Conforme o decreto nº 6.871 do MAPA (2009), o suco ou sumo é uma bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo, sendo proibida qualquer adição de aromas e/ou corantes artificiais. No que se refere à composição do suco de uva, deve conter no mínimo 14 °Brix de sólidos solúveis à 20 °C, acidez total de no mínimo 0,41 g. 100 g⁻¹ expressa em ácido tartárico, açúcares totais naturais da uva de no máximo 20 g. 100 g⁻¹ e sólidos totais de no mínimo 15 g. 100 g⁻¹ (BRASIL, 2000).

Para uma caracterização específica dos variados tipos de sucos de uva, a instrução normativa nº 14 (2018) do Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece padrões de identidade de qualidade da uva e seus derivados, produtos estes que são comercializados em território nacional, produzidos no Brasil e importados. Dentre os diferentes tipos, o que mais se destaca é o suco de uva integral produzido na sua concentração natural, sem adição de açúcares, corantes ou aromas. Além desse, o suco de uva concentrado é bastante consumido, sendo submetido à processo físico para a retirada de água suficiente para elevar no mínimo, 50% o teor de sólidos solúveis que estão presentes no respectivo suco de uva integral. O suco reconstituído é obtido através da diluição de suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor mínimo de sólidos solúveis estabelecido nos padrões de identidade e qualidade para cada tipo de suco integral. Já o néctar é considerado uma bebida não fermentada, obtida pela diluição em água potável da polpa da fruta, devendo conter uma quantidade mínima de 50% de suco de uva (BRASIL, 2013).

2.6 FRAUDE ALIMENTAR - ADULTERAÇÃO EM SUCO DE FRUTA

A preocupação em relação à saúde alimentar se tornou uma realidade na rotina de muitos brasileiros e, acabou por promover, um crescente avanço pela procura e consumo de bebidas à base de frutas com características nutricionais que auxiliam na prevenção e controle de doenças. A substituição do consumo de refrigerantes por

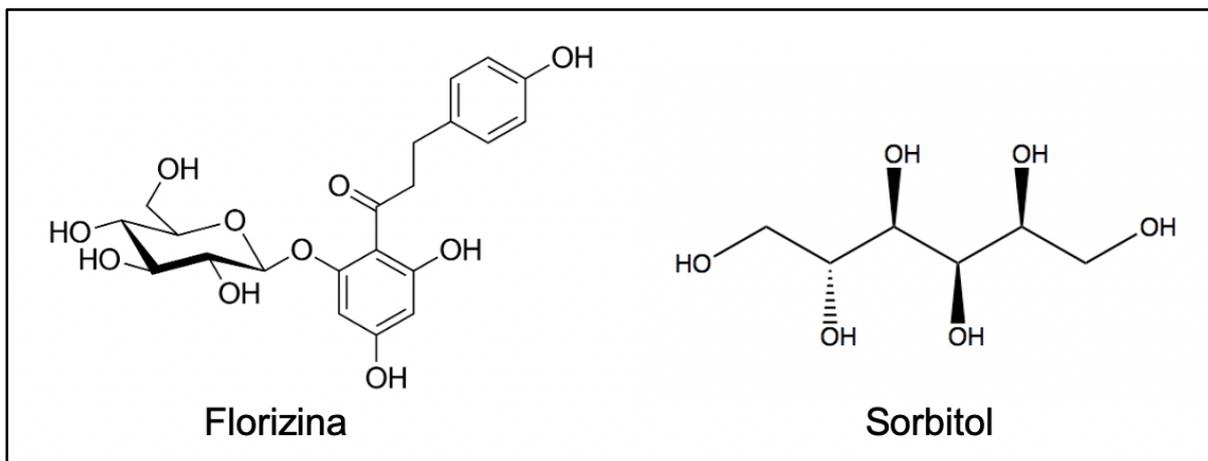
bebidas mais saudáveis e com apelo à praticidade é uma tendência mundial, aumentando a demanda por produtos naturais, orgânicos e enriquecidos nutricionalmente (ESPERANCINI, 2005).

Com o avanço da procura e a popularidade, os sucos à base de frutas são produtos bastante susceptíveis à adulteração e fraude. A adulteração de produtos alimentares é considerada como ato de substituição de constituintes com excessivo custo por outros que sejam mais acessíveis, ocultar algum componente e/ou adicionar determinados ingredientes. Em relação aos derivados de frutos, as adulterações mais comuns incluem a adição de água ou xarope, acidificação ou substituição por frutas mais baratas e adição de corantes ou flavorizantes (Singhal, Kulkarni & Rege, 1997; Asadpoor, Ansarin & Nemat, 2014; Rinke, 2016). Afirma-se que, estas práticas fraudulentas estão diretamente relacionadas, principalmente, com a visão pelo ganho econômico.

Conforme estabelecido pelo Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Normativa nº 14), o suco de uva deve possuir as características próprias da fruta, não podendo conter substâncias estranhas e, além disso, é proibida a adição de aromas sintéticos e corantes ao suco de uva. Uma vez que a comercialização de néctares mistos (contendo mais de uma fruta) está em expansão no mercado, para garantir sua autenticidade e para evitar a fraude, a presença declarada de cada fruta deve ser confirmada (SORIA et al., 2008).

Devido às características sensoriais e, especialmente o baixo custo, os sucos de maçã e caju são os mais comumente utilizados como adulterantes em sucos de frutas. Os compostos denominados florizina e o sorbitol (Figura 13) podem servir como auxiliares na identificação da adulteração do suco de uva com suco de maçã (SPINELLI, 2013). A florizina representa 90% dos compostos fenólicos encontrados em sucos de maçã e, em sucos de uva, pode ser encontrada em pequenas quantidades ou ausente. Pertencente ao grupo dos glicídeos, o sorbitol é um composto poliol considerado como um álcool resultante do metabolismo dos açúcares.

Figura 13 - Estrutura química da florizina e do sorbitol



Fonte: Adaptada de Spinelli (2013).

Para a identificação de possíveis fraudes, as técnicas que geralmente são utilizadas para a impressão de digitais de alimentos são as espectroscopias de RMN, infravermelho e UV-VIS pois possuem vantagens para a análise da estrutura e composição dos alimentos a serem estudados. As amostras podem ser analisadas em pequenas quantidades, de forma não destrutiva, simples e em curto tempo, com mínima preparação de amostra, além da determinação simultânea de um grande número de compostos (MIAW, 2018).

2.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

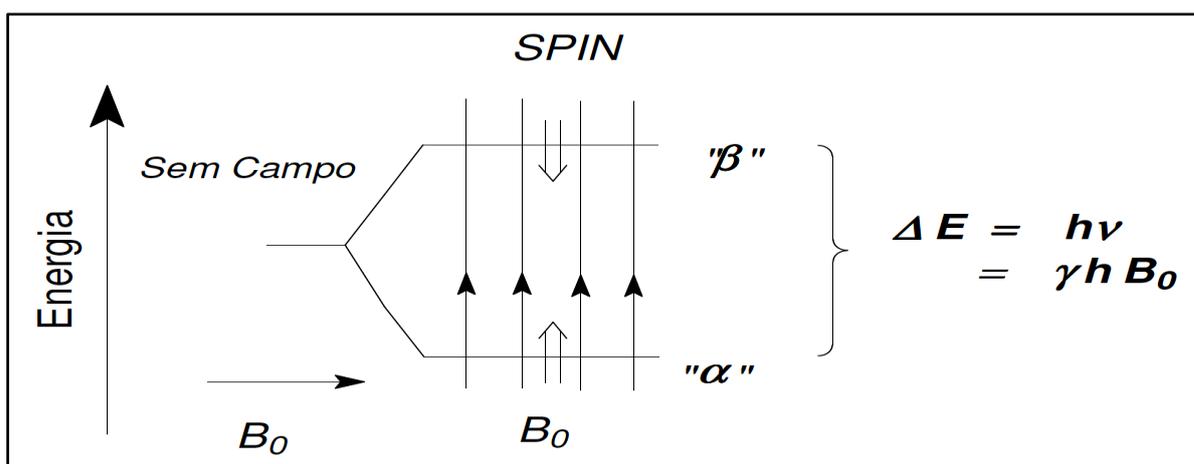
O fenômeno da Ressonância Magnética Nuclear foi observado experimentalmente pela primeira vez em 1946, por F. Bloch e E. Purcell, vencedores do Prêmio Nobel de Física no ano de 1952 (COLNAGO, et al.; 2002). O uso na área química, por sua vez, teve início anos mais tarde, de forma qualitativa, quando Proctor e Yu introduziram os conceitos de deslocamento químico, contribuindo assim para elucidação estrutural de compostos orgânicos (PROCTOR; YU, 1950).

Apesar de ser uma técnica relativamente nova, a RMN abrange diversos campos de aplicação em diferentes áreas. É considerada uma ferramenta extremamente relevante e versátil em diversos ramos da ciência como a química, física, biologia, materiais, ciências farmacêuticas e medicina. (GIL; GERALDES, 1987). Considerando a aplicação na área da química, com a RMN é possível realizar

estudos conformacionais e de dinâmica molecular, troca química e análises de cinética e equilíbrio químico (NASCIMENTO, 2018).

Conforme os conceitos de Venâncio (2005), a espectroscopia de RMN é baseada na interação da radiação eletromagnética com a matéria e, a forma como essa interação ocorre, depende da estrutura da espécie atômica ou molecular a ser estudada. Dessa forma, a técnica é caracterizada pelas propriedades magnéticas do núcleo atômico, baseadas nos conceitos de spin nuclear (expresso em termos de I) e momento magnético do núcleo. Em RMN, o número quântico I é observado em núcleos que contém o número quântico de spin diferente de zero, ou seja, em elementos que possuem número ímpar de prótons e/ou nêutrons (GIL; GERALDES, 1987). Sendo $I = \frac{1}{2}$, os núcleos dos isótopos contam com dois estados de energia, sendo estes o estado α ou “alinhado com o campo magnético principal” ($I = \frac{1}{2}$) e estado β ou “no sentido oposto ao estado α ” ($I = -\frac{1}{2}$). Quando ocorre a ausência de um campo magnético externo, os estados α e β apresentam o mesmo nível de energia e são expressos degenerados. Apesar disso, quando ocorre uma exposição desses núcleos em um campo magnético estacionário externo (B_0), uma separação de energia pode ocorrer entre os estados, resultando em uma pequena predominância do estado α , sendo este o estado de menor energia (Figura 14).

Figura 14 - Representação dos estados de energia dos núcleos com spin $I = \frac{1}{2}$

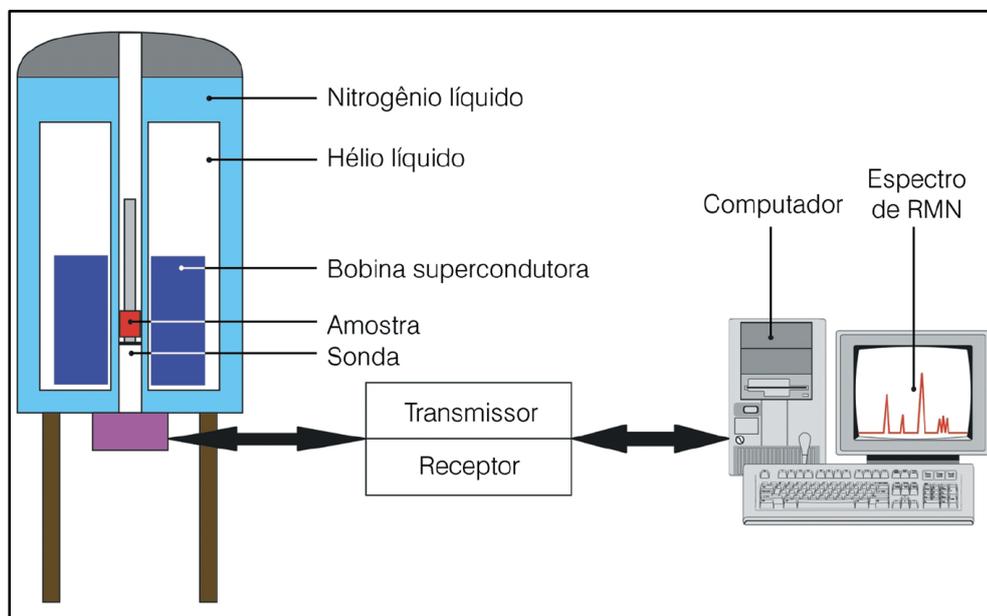


Fonte: Nascimento (2011).

Em análises de RMN em alta resolução é necessário aplicar ao FID (*Free Induction Decay*) uma operação matemática (transformada de Fourier), para que o

signal no domínio do tempo seja levado ao domínio de frequências. A partir disso é que se pode obter um espectro de RMN, representado na Figura 15 a seguir.

Figura 15 - Diagrama de um espectro de RMN



Fonte: Colnago; Almeida; Valente (2012).

2.8 QUIMIOMETRIA

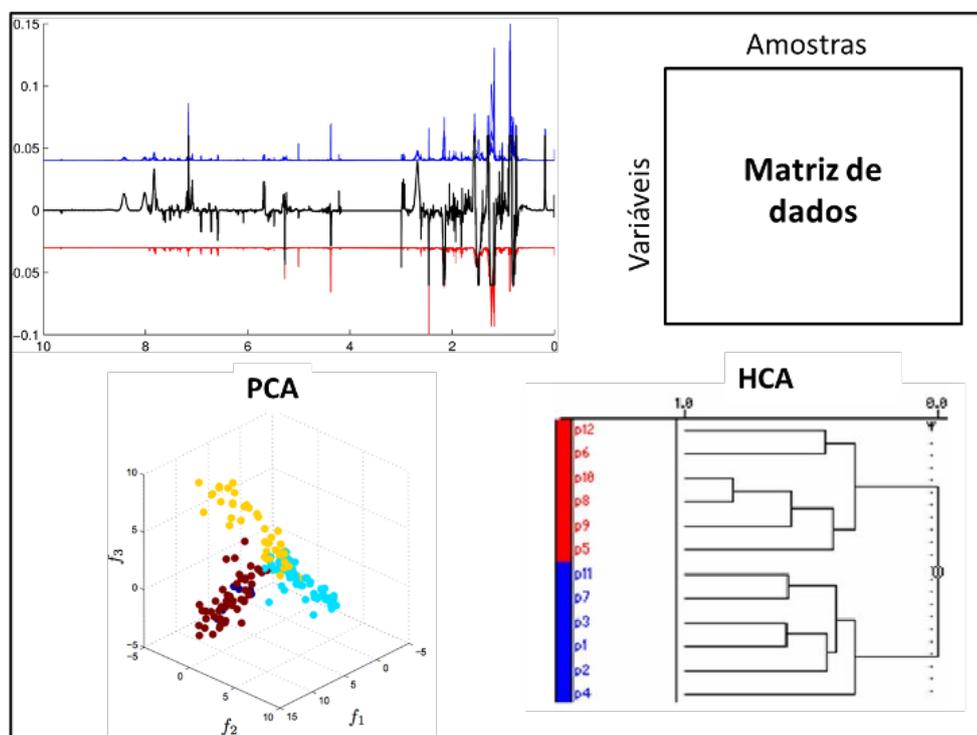
De acordo com a definição de Kowalski (1991), a quimiometria pode ser considerada como uma disciplina química que engloba métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação com a análise dos dados obtidos. A extração dessas informações possibilita a análise de um grande número de variáveis uma vez que, geralmente, apenas um pequeno número dessas variáveis apresenta importância para o objetivo do estudo. Dessa forma, o seu uso se faz necessário para avaliar e tratar grande quantidade de dados gerados por equipamentos analíticos de alta complexidade como RMN, por exemplo (O'DONNELL *et al.*, 2014).

As técnicas de análise multivariada mais utilizadas são as análises de agrupamento hierárquico (HCA) e a de componentes principais (PCA), representadas na Figura 16. Ambas são metodologias exploratórias, as quais revelam similaridades ou possíveis diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. A técnica de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*),

tem como principal objetivo reduzir o número de variáveis observadas. É um método quimiométrico não supervisionado, que consiste em um procedimento matemático que converte um banco de dados de variáveis possivelmente correlacionadas em um novo banco de dados com dimensionalidade reduzida e variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais (PC), (CROCOLI, 2019).

A análise de agrupamento hierárquico (HCA, do inglês *Analytic Hierarchy Process*) é um processo hierárquico sendo que em cada passo a matriz de dados é diminuída em uma dimensão pela reunião da formação de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo (PANERO et al, 2009). O objetivo dessa técnica é exibir os dados obtidos evidenciando os seus agrupamentos e padrões naturais. O método apresenta uma relação entre as amostras de tal forma que, as mais semelhantes sejam agrupadas entre si e, como resultado, um dendrograma é produzido agrupando observações em função da similaridade. No dendrograma quanto menor a distância entre os pontos, maior será a semelhança entre as observações (NETO; MOITA, 1998).

Figura 16 - Esquema ilustrativo do tratamento quimiométrico aplicado aos dados de RMN.



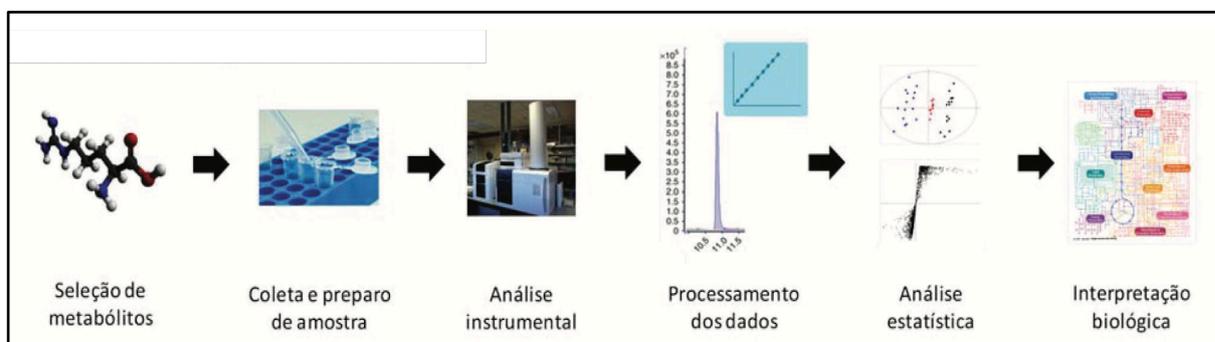
Fonte: Crocoli (2018).

2.9 ANÁLISE METABOLÔMICA

A metabolômica é definida como uma ciência "ômica", a qual busca pelo entendimento do funcionamento celular dos organismos e possíveis modificações biológicas. São incluídos neste conjunto de ciências, a genômica (estudo da alteração dos genes), a transcriptômica (estudo das alterações dos transcritos), a proteômica (estudo das alterações das proteínas), e a metabolômica que envolve o estudo das alterações dos metabólitos (CANUTO et al, 2017). Metabólitos são considerados produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica (FIEHN, MOL, 2002) e, dessa forma, a metabolômica pode ser definida como uma análise abrangente (de identificação e quantificação) de todos os metabólitos que estão presentes em um sistema biológico, com o objetivo de reunir a maior quantidade possível de informações metabólicas.

Podendo fornecer informações importantes referentes ao entendimento do fenótipo de um determinado organismo e desempenhando um papel fundamental na biologia de um sistema, a metabolômica vem sendo aplicada em diferentes áreas como análises clínicas, alimentos e nutrição, ambiental, toxicologia forense, análise de organismos patológicos (parasitas, bactérias, fungos) e entre outras (CANUTO et al, 2017). O uso da análise metabolômica para enfrentar situações relacionadas à fraude alimentar e identidade de alimentos, incluindo origem geográfica, maturidade e variedade de alimentos, apresentou um significativo aumento nas últimas décadas (SOBOLEV et al, 2019). Para o desenvolvimento de estudos metabolômicos é necessário seguir uma série de etapas, sendo estas representadas na Figura 17.

Figura 17 - Fluxograma de trabalho envolvido em análise metabolômica alvo



Fonte: Adaptada de Canuto, et al (2012).

Na prática, observa-se que esta análise se restringe ao uso de técnicas analíticas que fornecem uma visão geral dos metabólitos produzindo uma impressão digital metabólica do sistema (do inglês, *metabolic fingerprinting*) e buscando fatores discriminantes entre os grupos estudados através da quimiometria (SCHRIPSEMA, 2010). Sendo a RMN uma das técnicas mais utilizadas nas análises metabólicas, esta se destaca pois proporciona curto tempo de análise, reprodutibilidade e identificação estrutural.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras de sucos de uva e maçã foram adquiridas em um mercado da cidade de Caxias do Sul, visando diferentes marcas e tipos de formulação (suco integral, néctar, suco reconstituído). No total, 24 amostras foram analisadas (Figura 18). Estas foram numeradas de forma consecutiva de acordo com a aquisição, sendo o nome acrescido de uma letra maiúscula (em ordem alfabética). No entanto, quando as amostras foram provenientes do mesmo fabricante, embalagem e tipo de suco, porém, de lotes distintos, foram usadas letras/códigos para identificação.

Figura 18 - Amostras de sucos



Fonte: a autora (2020).

3.2 PREPARO DE AMOSTRA

Os sucos foram diretamente diluídos com solvente deuterado. Para isso, foram utilizados microtubos tipo Eppendorf[®], onde foram adicionados 580 μL de água deuterada (D_2O) (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Alemanha) e 20 μL de suco. Posteriormente, o volume total foi transferido para tubos de quartzo de RMN de 5mm sendo analisado na sequência.

3.3 ANÁLISE POR RMN

Todas as medidas de RMN foram obtidas em espectrômetro *Fourrier 300* Bruker® 9.4 Tesla (300,13 MHz para frequência de hidrogênio) com sonda BBI de 5 mm de diâmetro interno, com detecção reversa e bobinas de gradiente de campo na coordenada.

Todos os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 303 K e foram registrados em soluções D₂O usando tubos de quartzo de 5 mm. Os desvios químicos foram relatados em ppm, referenciados ao D₂O residual (4,69 ppm).

Para a análise, foi realizada a supressão do sinal da água residual, visando a melhor resolução dos sinais dos demais compostos presentes na amostra. Assim, no primeiro passo foram realizadas 2 varreduras (*number of scans, ns*), para identificação do sinal da água residual. Para esse processo foram utilizados os seguintes parâmetros previamente estabelecidos: tempo de espera de 1 s (*d1*) entre cada aquisição e um tempo de aquisição de 5,37 s (*aq*) com pontos de 65 Kb durante (*td*) e sequência de pulso *zg30* (90°), com duração de 15 µs (*p1*). O processamento desses espectros foi realizado com pontos de 65 Kb (*si*) por meio de multiplicação exponencial (*lb* = 0,3 Hz) e correção manual de fase e linha de base.

Na etapa posterior, para a supressão do sinal da água foi realizada a alteração da sequência de pulso para *zgpr* (90°), o tempo *d1* foi alterado para 4s. Em seguida, foram efetuadas 64 varreduras, a fim de acumular sinais possíveis de serem avaliados. Com esses parâmetros, o tempo total de análise de cada amostra foi de 3,48 minutos. Em todas as etapas, o programa TopSpin (Bruker Biospin®) foi utilizado para a coleta e processamento dos dados.

3.4 QUIMIOMETRIA

A Análise de Componentes Principais (do inglês, *PCA*) foi realizada para verificar a capacidade do método em separar amostras semelhantes umas das outras. Os espectros de RMN H¹ das 24 amostras foram usados como entrada para o programa Amix™ (Bruker®) para análise de componentes principais com o objetivo de criar uma visão geral e mostrar tendências, agrupamentos e *outliers* nos dados. A área ao redor da água não deuterada foi excluída do processo de distribuição de

buckets. Os dados foram tratados usando o método de distribuição retangular normal com um nível de confiança de 99,00%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como anteriormente destacado, o uso de RMN possui algumas vantagens em relação a métodos convencionais de análise, como os métodos cromatográficos, por exemplo. É uma técnica simples, robusta e abrangente que requer pouca ou nenhuma manipulação de amostra, podendo assim serem analisadas amostras biológicas intactas, sendo sólidos e/ou semi-sólidos (PUTRI et al, 2013; LENZ & WILSON, 2007). Dessa forma, entre as principais vantagens dessa técnica destacam-se a pequena quantidade de amostra necessária para análise, além da facilidade de preparo, ações que podem ser observadas nesta seção (PAULI, 2001).

4.1 ANÁLISE POR RMN

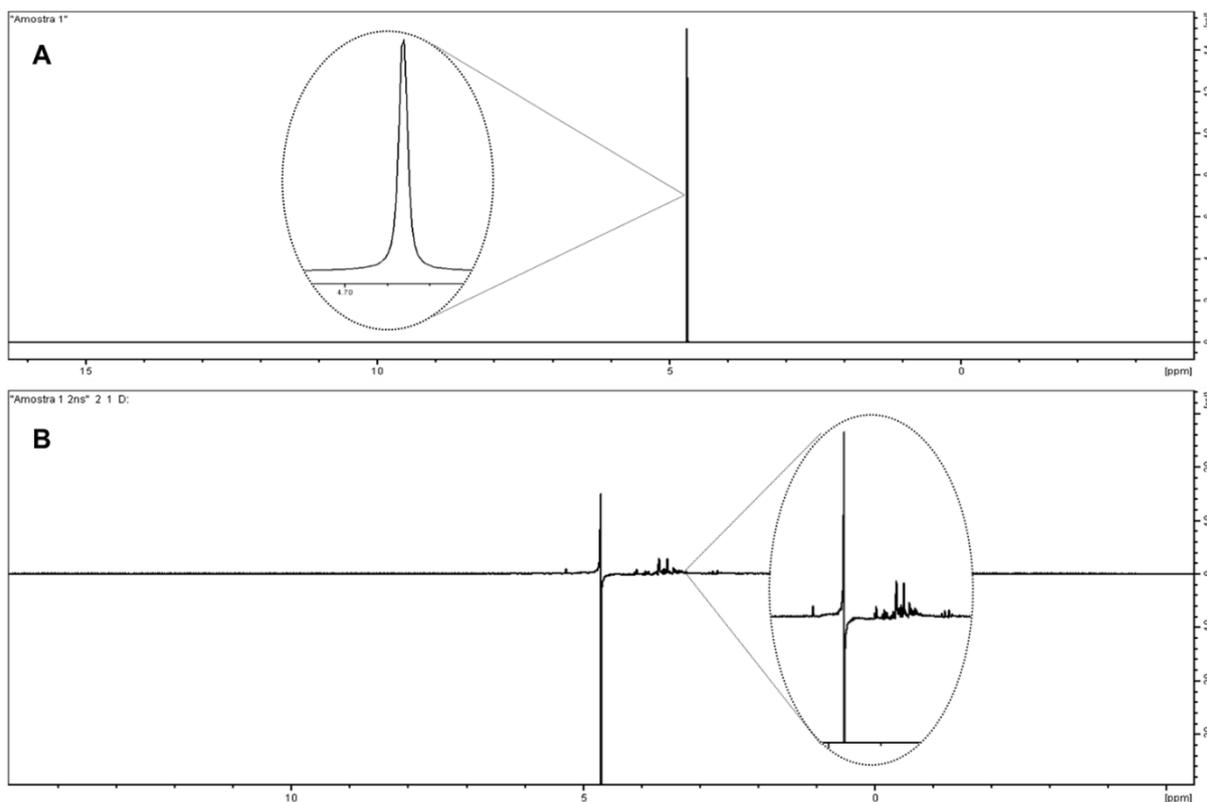
4.1.1 Supressão do sinal da água

Água é o principal componente do suco de uvas, sendo esta uma limitação na obtenção de espectros de RMN de ^1H . Isso porque o ganho do receptor é calculado sobre o sinal de maior intensidade, que neste caso, serão os hidrogênios que compõem a molécula de água. Desta forma, os sinais dos analitos da amostra perdem em intensidade. Para tornar os sinais da amostra perceptíveis para correta identificação, se faz necessário reduzir o sinal da água residual através de um processo de supressão (GRANDIZOLI et al., 2014; SANTANA, 2017).

Na Figura 19 temos a comparação, sem supressão (A) e com supressão (B). No primeiro, vemos apenas o sinal a 4,69 ppm, enquanto isso, na (B) observamos sinais na região entre 3,28 - 4,10 ppm, característica dos açúcares. Contudo ainda não é possível verificar a presença de outros compostos, sendo necessário aumentar o número de corridas. Há uma diferença na sequência de pulsos. A sequência zg, utilizada no primeiro caso, é aplicada apenas um pulso. Enquanto isso, a sequência zgpr (Figura 19B) contém bloco de pressaturação para suspensão do sinal do solvente, no caso a água. Contudo como se pode observar na região destacada, há uniformidades na linha base, distorcendo a região de pressaturação. Isso já foi reportado na literatura por Santana (2017), o qual ainda buscou ajustar a potência de supressão no sentido de suavizar a inversão do sinal e com isso melhorar as

distorções, no entanto, não obteve êxito. Assim, no presente estudo, não foram feitas alterações na metodologia do equipamento.

Figura 19 - Espectro obtido com 2 ns sem (A) e com (B) supressão do sinal da água

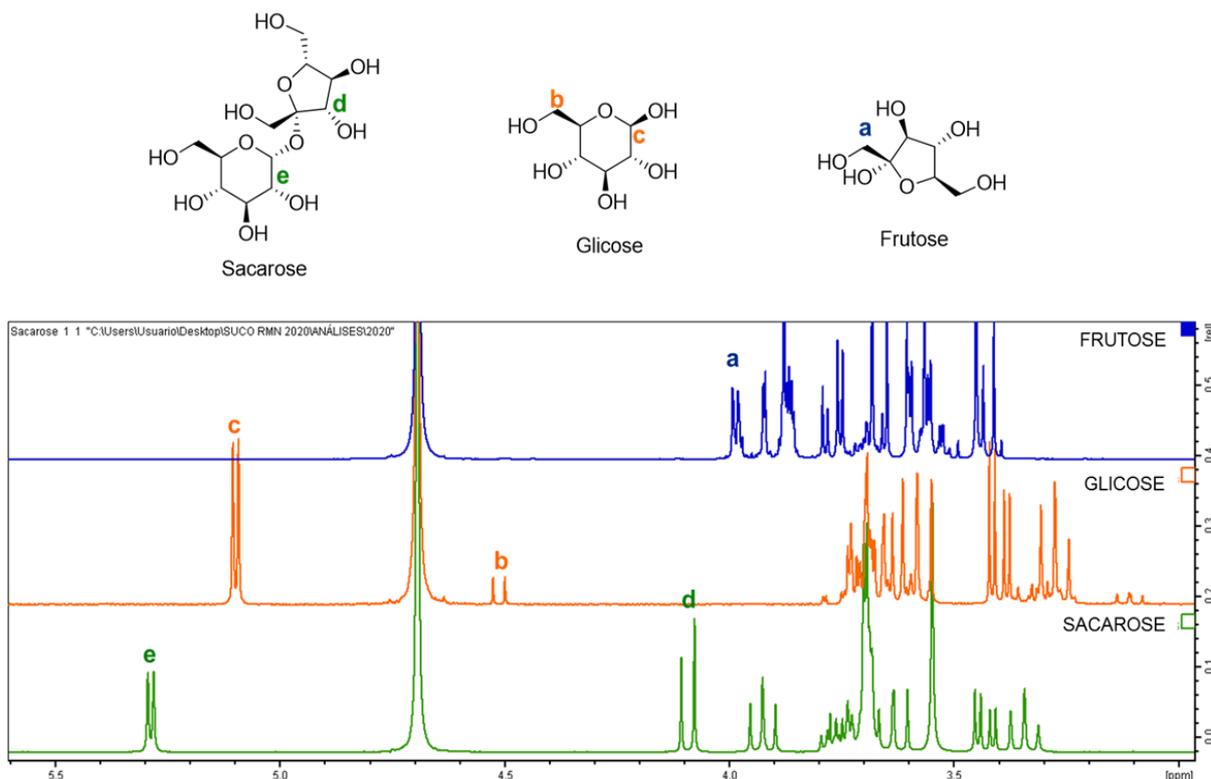


Fonte: a autora (2020).

4.1.2 Análise de padrões

Entre os principais componentes dos sucos de fruta estão os açúcares. Destes destacamos glicose, frutose e sacarose (resultante da ligação entre glicose e frutose), os quais apesar de possuírem semelhanças estruturais, possuem especificidades que as diferenciam nos espectros de RMN, como é possível observar nos espectros obtidos para análise dos padrões, apresentados na Figura 20.

Figura 20 - Comparação e atribuição dos sinais dos espectros obtidos para os padrões de glicose, frutose e sacarose



Fonte: a autora (2020).

4.2 AMOSTRAS REAIS

As características principais das amostras analisadas são apresentadas na Tabela 1 abaixo. Pode-se observar que a maioria das amostras representam suco de uva (73,9 %), integral (65,2 %) e embalados em frascos de vidro (52,2 %) (Figura 21).

Tabela 1 - Características das amostras analisadas

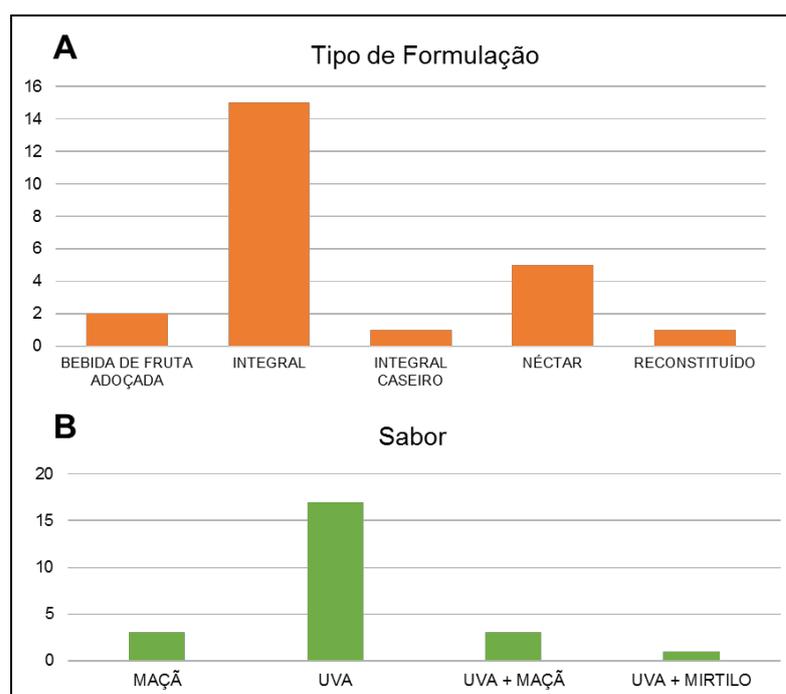
AMOSTRA	SABOR/ TIPO	TIPO	EMBALAGEM	VOLUME
Amostra 1	UVA	BEBIDA DE FRUTA ADOÇADA	PET	1,0 L
Amostra 2	UVA	INTEGRAL	Vidro	450 mL
Amostra 3	UVA	INTEGRAL	Vidro	1,0 L
Amostra 4	UVA + MIRTILLO	INTEGRAL	Vidro	1 L
Amostra 5	UVA	INTEGRAL	Vidro	1,5 L
Amostra 5A	UVA	INTEGRAL	Vidro	1,5 L
Amostra 6	UVA	INTEGRAL	Vidro	1,5 L
Amostra 7	UVA	INTEGRAL	Vidro	1,5 L
Amostra 8	UVA	INTEGRAL	Vidro	1,5 L
Amostra 9	UVA	INTEGRAL	Vidro	1,5 L
Amostra 10	UVA	INTEGRAL	Vidro	1,5 L

Amostra 11	UVA	INTEGRAL	PET	1,5 L
Amostra 12	UVA	NÉCTAR	Caixa	1,0 L
Amostra 12A	UVA	NÉCTAR	Caixa	200 mL
Amostra 13	UVA + MAÇÃ	NÉCTAR	Caixa	1,0 L
Amostra 14	UVA + MAÇÃ	NÉCTAR	Caixa	1,0 L
Amostra 15	MAÇÃ	INTEGRAL	PET	900 mL
Amostra 16	MAÇÃ	INTEGRAL	Caixa	200 mL
Amostra 17	MAÇÃ	INTEGRAL	Caixa	200 mL
Amostra 18	UVA	INTEGRAL	Caixa	200 mL
Amostra 19	UVA	NÉCTAR	Caixa	200 mL
Amostra 20	UVA/	BEBIDA DE FRUTA ADOÇADA	Caixa	200 mL
Amostra 21	UVA + MAÇÃ	RECONSTITUÍDO	Vidro	1,5 L
Amostra 22	UVA	INTEGRAL*	Vidro	300 mL

*Amostra de suco de uva integral obtido através do processo caseiro.

Em relação ao tipo de formulação, além dos sucos integrais, foram analisados: néctar (21,74 %), bebida de fruta adoçada (8,69 %), reconstituídos e integral caseiro (ambos 4,35 %) (Figura 21A). Ainda, foram adquiridas formulações de suco de uva adicionado de suco de mirtilo (4,35%), suco de maçã (13,04 %) e suco de uva adicionado de maçã (13,04%) (Figura 21B).

Figura 21 - Gráficos com as características das amostras: tipo de formulação, sabor e embalagem



Fonte: a autora (2020).

Observando as informações contidas nos rótulos das amostras (Tabela 2), é possível observar que, mesmo em amostras de suco integral, são adicionados antioxidantes, conservantes e até mesmo aromas. A legislação brasileira não é clara em relação a adição destes compostos em suco integral, abrindo margem para que isso ocorra. Porém, informações como “100% suco” são comumente encontradas destacadas nos rótulos, levando o consumidor a acreditar que está consumindo somente suco da fruta (BRASIL, 2009).

Em relação aos açúcares, a análise dos rótulos fornece somente informações sobre o teor de carboidratos totais e nenhuma informação a respeito dos teores individuais de carboidratos com glicose e frutose. Ainda, nenhuma amostra de sucos integrais analisados apresentava em seu rótulo um aviso ao consumidor diabético sobre os teores de glicose e frutose contidos na bebida. Embora essa informação não seja exigida pela legislação brasileira vigente, é importante, visto que, altos teores de açúcares podem representar um fator de risco para pessoas cuja dieta possui restrição de carboidratos (ZANCHIM et al., 2018).

Tabela 2 - Ingredientes rotulados em cada amostra

AMOSTRA	INGREDIENTES ROTULADOS
Amostra 1	Água, açúcar, sucos concentrados de maçã e uva, vitamina C, regulador de acidez ácido cítrico, aroma sintético idêntico ao natural, estabilizantes carboximetilcelulose sódica e goma xantana, conservadores sorbato de potássio e benzoato de sódio, sequestrantes hexametáfosfato de sódio e EDTA cálcio dissódico, corantes artificiais amaranço, azul brilhante FCF e tartrazina, edulcorantes acesulfame de potássio e sucralose
Amostra 2	Uva e antioxidante INS 220
Amostra 3	Uva <i>in natura</i>
Amostra 4	Mirtilo e uva <i>in natura</i>
Amostra 5	Água e suco concentrado de uva
Amostra 5A	Água e suco concentrado de uva
Amostra 6	Suco de uva, conservante INS 202 e antioxidante INS 220
Amostra 7	Uva e antioxidante INS 220
Amostra 8	Água, suco concentrado de uva e aroma natural de uva
Amostra 9	Água, suco concentrado de uva e aroma natural de uva
Amostra 10	Suco de uva, conservante INS 202 e antioxidante INS 220
Amostra 11	Suco de uva, conservantes INS 202 e INS 242 e INS 20 e antioxidante INS 220
Amostra 12	Água, suco concentrado de uva, açúcar, antioxidante ácido ascórbico, acidulante ácido cítrico e aroma natural de uva.

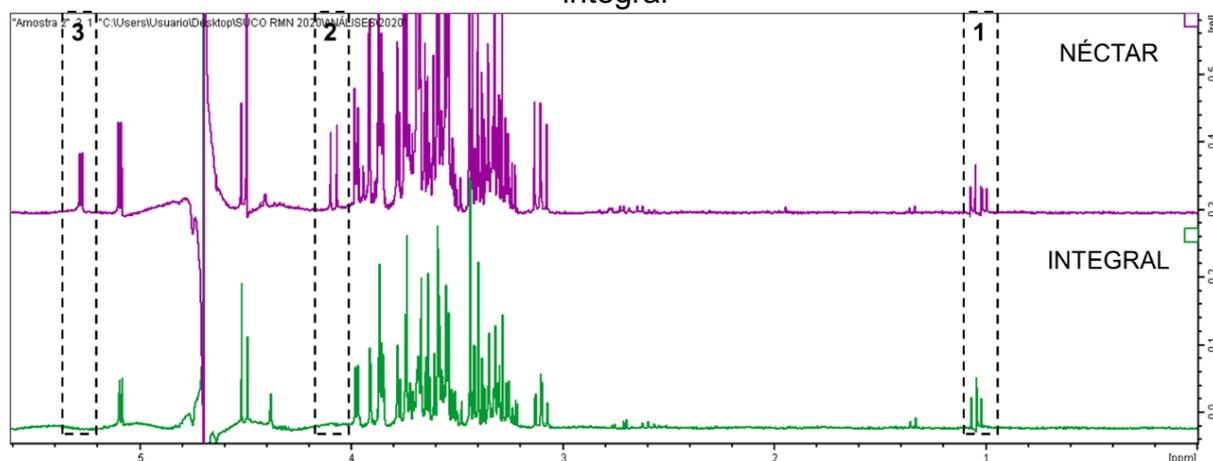
Amostra 12A	Água, suco concentrado de uva, açúcar, antioxidante ácido ascórbico, acidulante ácido cítrico e aroma natural de uva.
Amostra 13	Água, açúcar, suco concentrado de uva, suco concentrado de maçã, acidulante ácido cítrico, aroma natural de uva e aroma natural de maçã.
Amostra 14	Água, suco concentrado de uva, açúcar, suco concentrado de maçã, vitamina C, aroma natural, regulador de acidez ácido cítrico e estabilizante goma xantana.
Amostra 15	Suco natural de maçã e vitamina C.
Amostra 16	Suco de maçã concentrado, água e aroma natural de maçã.
Amostra 17	Água, suco de maçã concentrado, acidulante ácido cítrico e aroma natural de maçã.
Amostra 18	Água, suco de uva concentrado e aroma natural de uva.
Amostra 19	Água, açúcar, suco concentrado de uva, acidulante ácido cítrico e aroma natural de uva.
Amostra 20	Água, açúcar, sucos concentrados de uva e maçã, vitaminas (C, E, B3, A, D, B6 e B12) acidulante ácido cítrico e aromatizante, corante natural antocianina e estabilizante goma guar.
Amostra 21	Suco de uva e maçã concentrados, água, aroma natural de uva, acidulante ácido ascórbico.
Amostra 22	*

*Por ser amostra caseira, não possui rótulo.

4.2.1 Atribuições dos sinais de RMN de ^1H

Amostras de suco integral e néctar foram analisadas e comparadas. Os espectros apresentados na Figura 22, indicam diferenças entre estes, sendo as principais os sinais: (3) em 5,28 ppm; duplete (2) em 4,08 ppm, os quais são referentes a sacarose, presente no “néctar”.

Figura 22 - Comparação entre espectros obtidos para amostra de néctar e suco integral

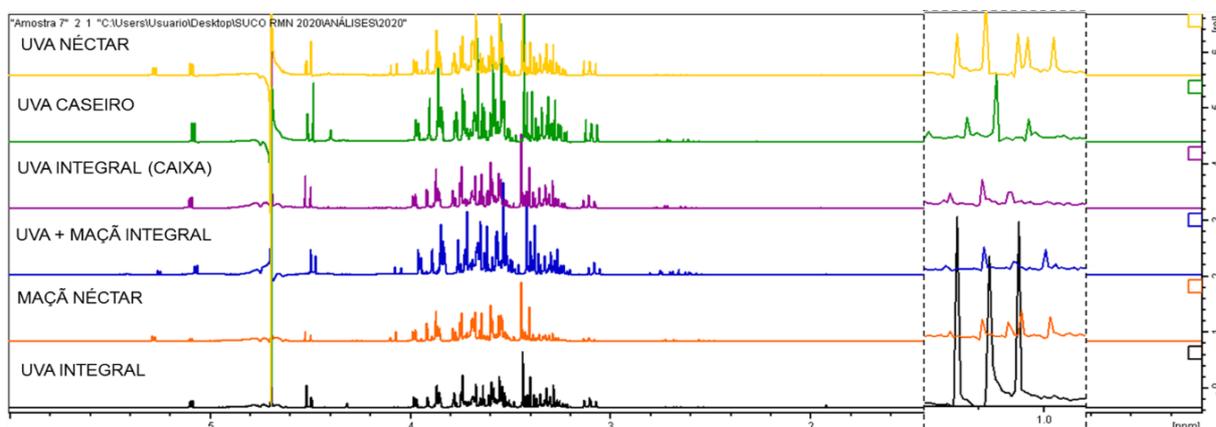


Fonte: a autora (2020).

Outra diferença é o tripleto (1) em 1,00 ppm, também na amostra de néctar. Este sinal em questão tem características do próton com conexão H-C-C-O, sendo reportado como sinal referente a três possíveis compostos: a rhamnose oriunda da glicosilação das antocianinas (ZHANG; BUTELLI; MARTIN, 2014), o 2,3-butanodiol, originário de fermentações intracelulares, principalmente quando a fruta colhida é mantida por longo prazo de tempo antes do início do processo de fabricação do suco integral (YANG; KAKUDA; SUBDEN, 2006) e a goma xantana, a qual é utilizada como espessante nos sucos do tipo néctar (SANTANA, 2017).

Além dos carboidratos, outra molécula que é um marcador importante em sucos de frutas é o etanol, o qual foi identificado na maioria das amostras, com maior destaque às de suco integral, pois é o mais “puro”. Embora seja classificado como bebida não alcoólica a legislação brasileira estabelece um teor máximo de álcool de 0,5% v/v, o que equivale aproximadamente a 4,0 g L⁻¹ de etanol (RIZZON, 2010). Este pode ser proveniente da fermentação residual que é geralmente ocasionada por microrganismos resistentes ao calor. No mesmo sentido, tendo em vista o teor de carboidratos contidos nesse tipo de suco, a concentração alcoólica pode aumentar com um tempo maior de armazenamento ou por conta das condições de estocagem após a bebida ser aberta para consumo. Em adição, o teor de álcool pode ainda crescer em formulações que não contêm aditivos ou estabilizantes (GRANDIZOLI et al., 2014) (Figura 23).

Figura 23 - Comparação do sinal do etanol (1,04 ppm) para os espectros de diferentes tipos de suco



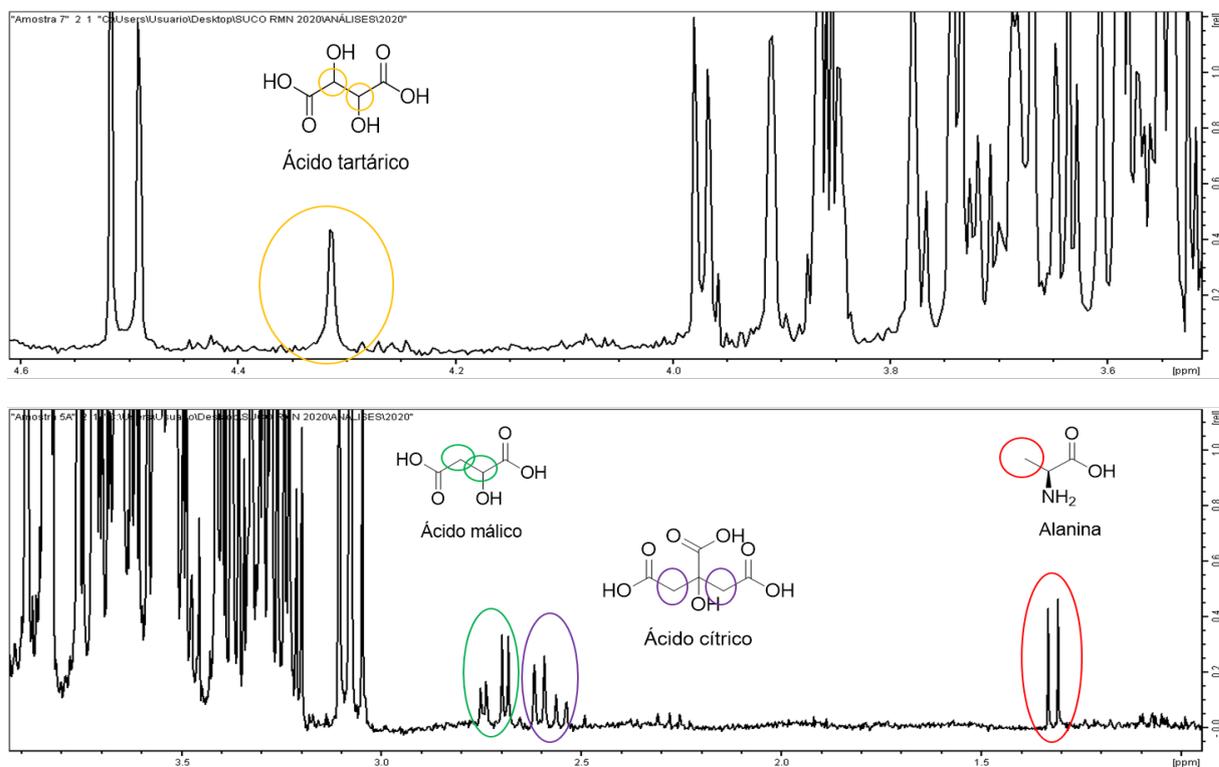
Fonte: a autora (2020).

Por fim, foi possível a identificação dos ácidos málico, tartárico e cítrico e do aminoácido alanina. Estes compostos são os principais responsáveis pela acidez das uvas bem como de seus derivados processados (RIZZON; SGANZERLA, 2007) (Figura 24).

O ácido tartárico encontrado nesta fruta é o isômero L (+), o qual é um metabólito secundário presente em poucas espécies vegetais, sendo a videira um exemplo (OIV, 2007). Este composto pode ser identificado pelo singlete a 4,31 ppm, que representa os hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C3 em destaque na Figura 24.

Da mesma forma, para o ácido málico foi possível identificar os dubletos em 2,69 e 2,74 ppm, característicos dos hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C3, em verde destacado na Figura 24. No mesmo sentido, o ácido cítrico é representado pelos sinais destacados em roxo, os quais são provenientes dos hidrogênios ligados aos carbonos C2 e C4, Figura 24.

Figura 24 - Identificação dos sinais dos ácidos tartárico, málico e cítrico e do aminoácido alanina em espectros de suco de uva integral



Fonte: a autora (2020).

O ácido málico que é encontrado na uva em forma do isômero L (-), é um dos ácidos orgânicos mais difundidos na natureza, com predominância em grande número de vegetais. Na videira, a síntese do ácido málico é resultante de uma reação secundária da fotossíntese, ocorrendo principalmente nas folhas adultas da videira. Porém, pode ser sintetizado nos grãos em formação, até o momento do início da fase de maturação (RIBÉREAU-GAYON, 1968). No grão, uma parte do ácido málico é provido da oxidação da glicose na respiração. Além disso, o ácido cítrico existente nas raízes da videira é precursor do ácido málico da folha e do grão. O teor mais elevado (25 a 30 g L⁻¹) de ácido málico no grão da uva é registrado no início da maturação (RIZZON; SGANZERLA, 2007). Contudo, a degradação do ácido málico é bastante influenciada pela alta temperatura, o que pode ocorrer no processo de pasteurização do suco de uva, diminuindo a concentração encontrada para esse ácido neste tipo de amostra (KLIEWER et al., 1967).

O ácido cítrico, assim como o descrito anteriormente, é encontrado em inúmeras espécies vegetais. Todavia, encontra-se em maior quantidade nas plantas cítricas e, em pequena quantidade, na uva (RIZZON; SGANZERLA, 2007). Devido a isso e a fatores de diluição, em poucas amostras deste estudo foi possível a identificação deste composto.

Já a alanina, já descrita anteriormente por DUTRA, DAUTH e SOUZA (1999) como o principal aminoácido presente na uva, foi identificado na maioria das amostras de suco de uva integral. Isto é devido a metila terminal da molécula, conforme destacado em vermelho na figura 24.

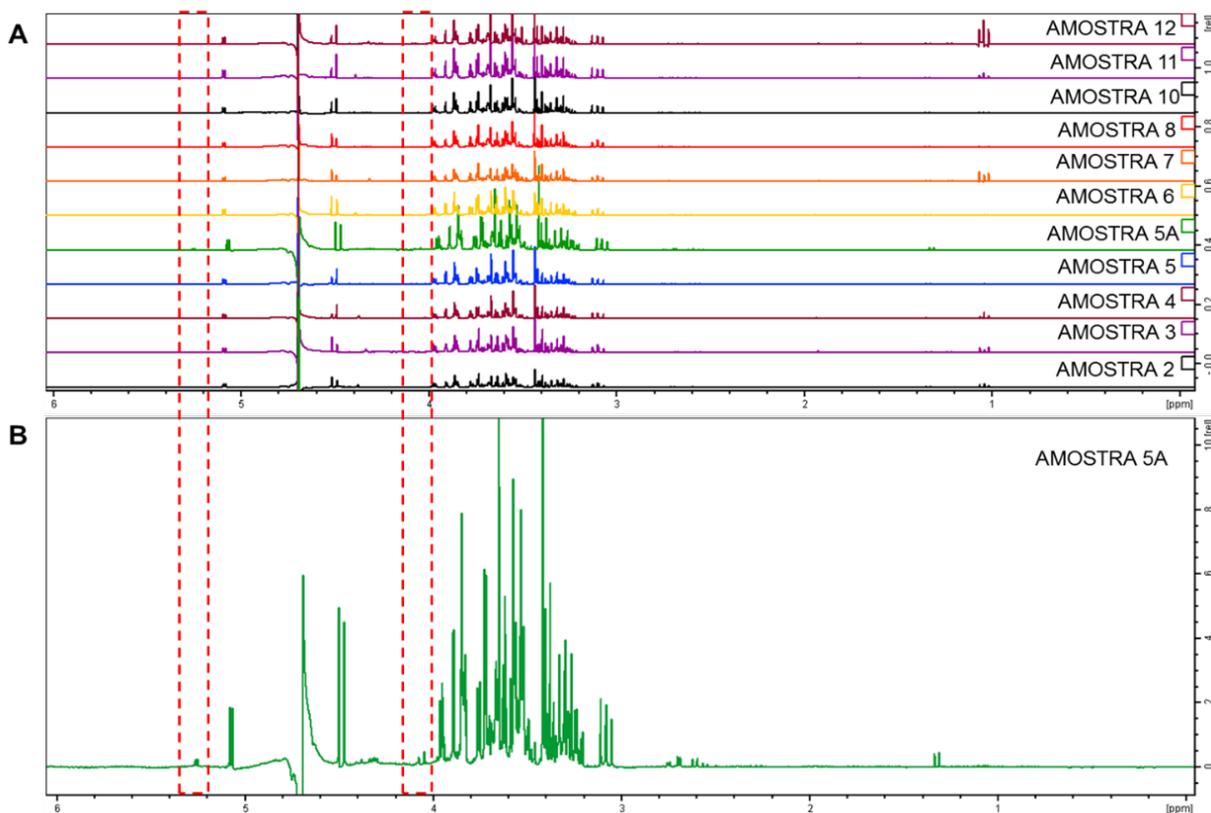
Dentre todos os compostos identificados, somente a glicose e frutose foram encontrados em todas as amostras. Inúmeros fatores podem estar relacionados a isso: variedade de uva usada na fabricação, concentração do suco, processo de fabricação, uso de aditivos, armazenamento antes e após abertura do frasco (ABE et al., 2007; GRANDIZOLI et al., 2014).

4.2.2 Adulteração

O suco de uva é um produto de alto valor comercial, sendo suscetível a muitas formas de adulteração, tais como adição de água, açúcar ou sucos de frutas de adição de menor valor comercial, como suco de maçã (SPINELLI et al., 2016).

Comparando todos os espectros obtidos para amostras de suco integral (amostras 2-12), é possível observar que o perfil dos sinais se mantém para a maioria das formulações (Figura 25A). Contudo, para a amostra 5A (Figura 25B), verificamos a presença de sinais em 5,28 ppm e 4,08 ppm, sinais característicos da sacarose, conforme visto anteriormente.

Figura 25 - Comparação dos espectros obtidos para amostras de suco integral



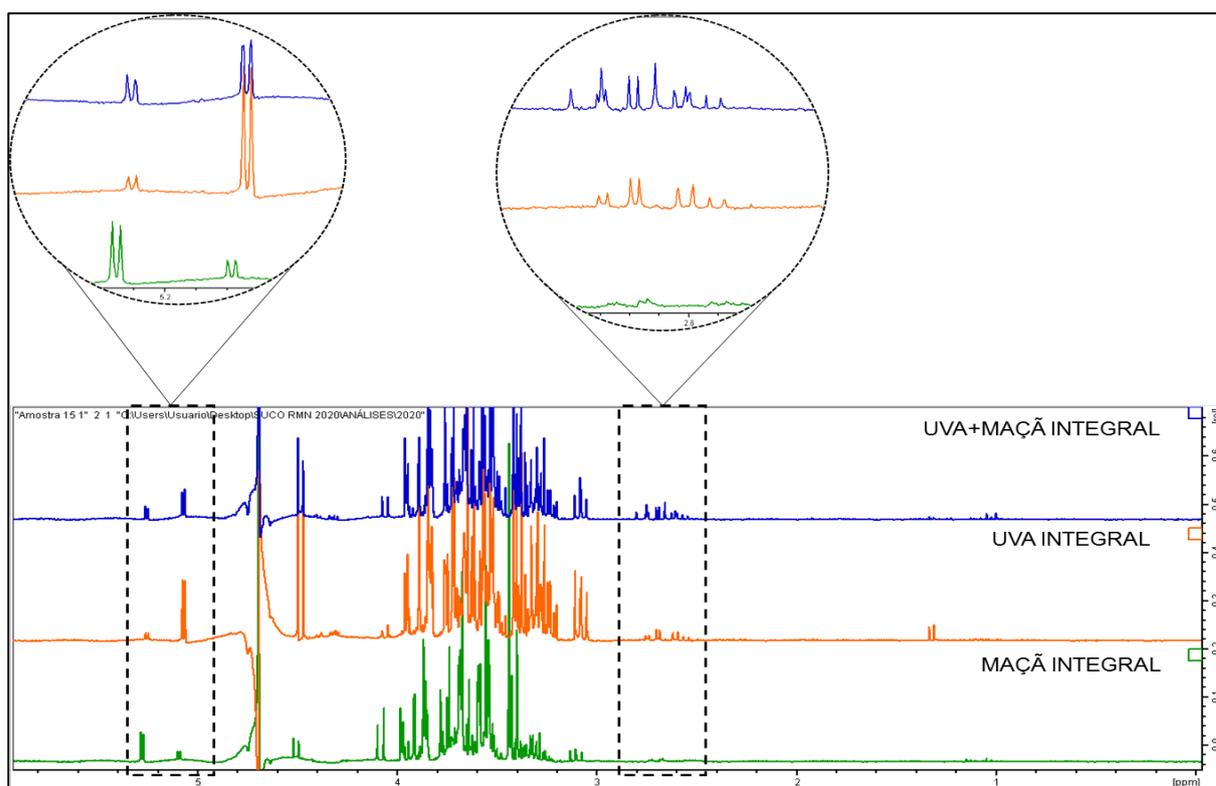
Fonte: a autora (2020).

A sacarose é o principal carboidrato produzido nas folhas e é translocada até o fruto onde acontece a ação de enzimas invertases convertendo-se em glicose e frutose. A presença desse composto não é observada no suco integral, porém, algumas variedades de uva podem apresentá-lo em baixíssimo teor (na ordem de 2 %). Ou ainda no caso da variedade *V. vinifera* pode chegar a 10 % (KLEWER, 1966; LIU et al., 2006). Assim, é provável que tenha sido adicionado sacarose na amostra citada, contudo, para certificar que o teor de sacarose está acima do permitido pela legislação, é necessário o desenvolvimento de uma metodologia quantitativa.

Em relação a amostras de suco de maçã, os sinais observados foram semelhantes aos encontrados para o suco de uva. A figura 26 abaixo, apresenta a

comparação de espectros de suco integral de maçã, uva e uva com maçã. Nestes, notamos claramente a mudança dos deslocamentos de sinais já caracterizados anteriormente para amostras de suco de uva. Isso é devido aos diferentes valores de pH para as amostras (média de 2,85 para suco de uva e 3,96 para suco de maçã). Mudanças de deslocamento químico associados a mudanças de pH já foram reportadas na literatura para análise de ^1H RMN de suco de cenoura pronto para beber (SAPIENZA et al., 2016) e para sucos frescos de laranja e uva (NAVARRO et al., 2020). Outras matrizes também apresentam esse fato, como no caso de formulações de agrotóxicos baseados em glifosato reportado por CROCOLI, ORTIZ e MOURA (2019) e no caso do fármaco furosemida, discutido por DA COSTA, ALCANFOR e DE OLIVEIRA em 2016.

Figura 26 - Comparação de espectros de suco integral de maçã, uva e uva com maçã, evidenciando as mudanças de deslocamento químico e a ausência dos sinais de ácido málico na amostra de suco de maçã



Fonte: a autora (2020).

Ao contrário do esperado, não foi possível identificar a presença de ácido málico na amostra de suco de maçã integral. Contudo, na amostra de suco de uva adicionada de suco de maçã integral, houve um aumento significativo nos sinais

relativos ao ácido. Isso pode levantar inúmeros questionamentos a respeito da origem do suco de maçã, já que o ácido em questão é característico dessa fruta (MONAKHOVA et al., 2014; RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005). Dessa forma, se faz necessário analisar uma maior variedade de sucos de maçã, a fim de verificar a real presença de ácido málico e outros compostos característicos deste tipo de amostra.

Já no espectro obtido para a amostra de suco de uva com maçã, é possível verificar a presença de um maior número de sinais na região entre 2,53 e 2,81 ppm, quando se comparado ao espectro do suco de uva integral. Esses sinais podem ser atribuídos a demais compostos já identificados para o suco de maçã, como asparagina e ácido pirúvico e aspártico (CUSANO; SIMONATO; CONSONNI, 2018).

Assim, tendo em vista a identificação dos sinais descritos anteriormente e análise de um maior número de amostra com suco de maçã, se pode afirmar que RMN pode ser utilizada para diferenciar amostras de suco de uva possivelmente adulteradas com maçã e com adição de sacarose.

4.3 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA (PCA)

O modelo PCA foi construído a partir de dados de ^1H RMN de 24 amostras de suco de uva e maçã, sobre as quais os dois componentes principais, PC1 e PC2, explicam juntos 96,47% da variância total (Figura 27). Como pode ser observado, ocorre a formação de três grupos distintos.

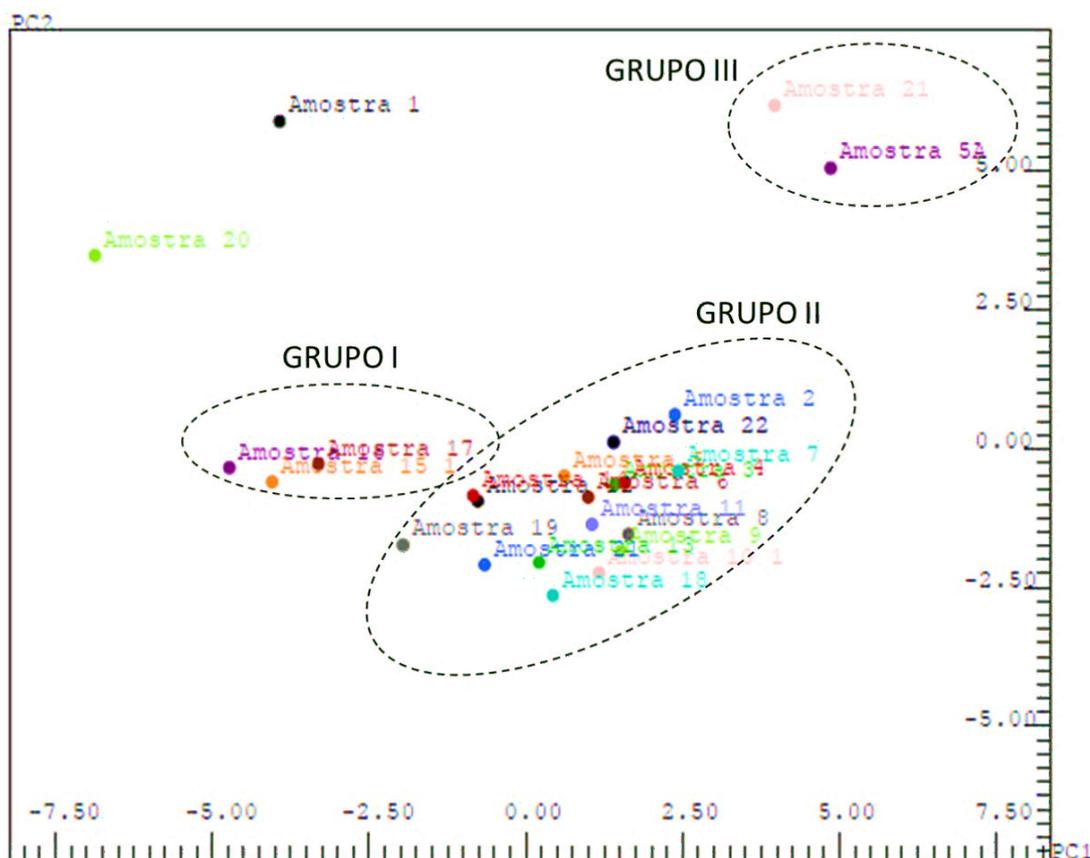
O Grupo I é composto de três amostras: Amostras 15,16 e 17. Estas são as três amostras de suco de maçã avaliadas. Esse resultado demonstra que o método é capaz de separar estatisticamente amostras de suco de uva e de suco de maçã, quando puros.

No Grupo II, no entanto, estão presentes amostras das mais diversas classes: néctar, integral, caseiro. Com isso, destaca-se que as amostras que contém suco de uva não possuem diferença estatística, independentemente de sua forma de fabricação.

Ao contrário, no Grupo III são encontradas as amostras 5A e 21, que são de suco de uva integral e de suco de uva integral com maçã, respectivamente. A amostra 5A já foi reportada anteriormente por apresentar sinais característicos de sacarose que, possivelmente foi adicionada a amostra. A amostra 21, por sua vez, é a única amostra de suco de uva com maçã integrais. A similaridade estatística entre as

amostras, pode ser proveniente da concentração dos açúcares ou da possível adição de suco de maçã na amostra 5A. Outro fator que deve ser levado em consideração é que os sucos em questão são fabricados pela mesma empresa, podendo haver adição de algum composto que não foi possível identificar visualmente, mas que pode alterar estatisticamente as características dos espectros.

Figura 27 - Resultado de PCA obtido para as amostras analisadas



Fonte: a autora (2020).

As amostras 1 e 20 não formaram grupos. Estas representam sucos de uva, comercializados na forma de néctar. Apesar do estudo avaliar outras amostras com as mesmas características, estas em específico, são do mesmo fabricante, o que pode indicar similaridades no processo de produção.

Outros autores já fizeram uso de PCA para separar amostras de suco. OLIVEIRA e colaboradores (2019) avaliaram por espectrometria de massas a adição de maçã em suco de uva. Os mesmos analisaram 19 amostras, das quais 3 foram de suco de maçã. Neste trabalho o PCA explicou 98,92% da variância e foi capaz de

separar as amostras de suco de uva e maçã. Neste caso, a concentração dos açúcares foi responsável pela diferença estatística.

Já em 2016, TOMASSINI e colaboradores, avaliaram a diferença de metabólitos presentes em diferentes sucos de cenoura vendidos prontos para o consumo na Itália. Os mesmos realizaram as análises por ^1H RMN e realizaram PCA a fim de verificar a separação das amostras de sucos de diferentes cultivares de cenoura. Neste trabalho, o PCA apresentado explicou 55% da variância total e foi capaz de separar em três grupos, representativos das três cultivares avaliadas.

Com isso, se pode concluir que, com pouco preparo de amostra, o uso de RMN ^1H juntamente com a metabolômica e PCA é capaz de transmitir resultados confiáveis para caracterização de sucos de uva e maçã, bem como identificar fraudes e adulterações.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos através do método de RMN ^1H , com pouco preparo de amostra, foi possível realizar uma leitura dos espectros referentes às amostras de sucos de uva e de maçã de diferentes tipos de fabricação e formulação. Um destaque é a presença da molécula de etanol em grande parte das amostras, principalmente àquelas de suco integral. Apesar de ser considerada como bebida não alcóolica, baixos teores de álcool podem estar presente em sua composição devido ao processo de fermentação residual, maior tempo de armazenamento ou ainda, devido às condições de acomodação em que a bebida foi exposta após aberta para consumo. Além da molécula de etanol, também foi possível a identificação dos ácidos málico, tartárico e cítrico, os quais são característicos da acidez. Dentre todos os compostos identificados, somente a glicose e a frutose foram encontradas em todas as amostras, fato que, pode estar relacionado com a concentração do suco, processo de fabricação, uso de aditivos e armazenamento.

Por outro lado, no que diz respeito a análise quimiométrica, a construção de um modelo de PCA referente aos resultados dos espectros obtidos, proporcionou através da formação de grupos, um melhor entendimento das semelhanças e diferenças entre as amostras analisadas. Em resumo, RMN pode ser considerada para avaliação de fraudes em sucos de uva.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Obter e avaliar um maior número de amostras com diferentes características;
- otimizar o método de RMN ^1H afim de melhorar a resolução dos resultados obtidos;
- identificar um maior número de metabólitos para melhor diferenciação das amostras;
- quantificar os compostos identificados.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. v. 27, n. 2, p. 394–400, 2007.

ABPM. **Anuário HF 2016**. 2016. Disponível em: <http://www.abpm.org.br/portugues/mensagens/imprensa/185_2016/anuario_hf_2016_maca.pdf>. Acesso em: 28 out. 2020.

ASADPOOR, M.; ANSARIN, M.; NEMATI, M. Amino acid profile as a feasible tool for determination of the authenticity of fruit juices. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, p. 359, 2014.

BARBOSA, A. G. Maria; et al. Doenças da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 37, n. 291, p. 86-98, 2016.

BENVENUTTI, Laís. **Avaliação da extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã com etanol para aplicação em sidra**. 2018. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

BOTELHO, R. V.; PIRES, E. J. P. Viticultura como opção de desenvolvimento para os Campos gerais. In: **II Encontro de fruticultura dos Campos Gerais**. 2009. Universidade estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. v. 1. p. 40-54. 2009.

BRASIL. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm>. Acesso em: 22 out. 2020.

BRASIL. **Instrução normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000**. Art.2º- Aprovar os Regulamentos Técnicos para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa das seguintes frutas:..., e para suco das seguintes frutas:..., maçã,... conforme consta do Anexo II desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2000.

BRASIL. **Instrução normativa nº 42, de 11 de setembro de 2013**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/31054165/do1-2013-09-12-instrucao-normativa-n-42-de-11-de-setembro-de-2013-31054161> Acesso em: 09 Dez. 2020.

BRESOLIN, B.; GULARTE, M.A.; MANFROI, V. Água exógena em suco de uva obtido pelo método de arraste a vapor. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 07, n. 01; p. 922-933, 2013.

BOYER, J.; LIU, R. H. Apple Phytochemicals and Their Health Benefits. **Nutrition Journal**, v. 3, p. 1-15, 2004.

CAMARGO, A. Umberto. **'Isabel Precoce': Alternativa para a Vitivinicultura Brasileira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves. (Comunicado Técnico nº 54). 2004.

CANUTO, G. A. B. et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Quim. Nova**, Vol. 41, No. 1, 75-91, 2018.

COLNAGO, L. A.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE A. P. Espectrometria de Massa e RMN Multidimensional e Multinuclear: Revolução nos Estudos de Macromoléculas Biológicas. **Química Nova na Escola**, v. 16, p. 9–14, 2002.

CAMARGO, A.C.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. **BRS Violeta: nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 8 p. (Comunicado Técnico, 63).

CROCOLI, C. Luana. **Desenvolvimento e validação de métodos por ressonância magnética nuclear – modo quantitativo (RMNq): aplicação a análise de pesticidas**. 2019. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2019.

CROCOLI, L. C.; ORTIZ, R. S.; MOURA, S. Development and validation of a qNMR method for analyses of legal and illegal formulations of glyphosate. **Analytical Methods**, v. 11, p. 4052–4059, 2019.

CUSANO, E.; SIMONATO, B.; CONSONNI, R. Fermentation process of apple juice investigated by NMR spectroscopy. **Lwt**, v. 96, n. April, p. 147–151, 2018.

DA COSTA, L. F.; ALCANFOR, S. K. B.; DE OLIVEIRA, A. L. Development and Validation of Furosemide Quantification Method By ¹H NMR. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1683–1692, 2016.

EMBRAPA (2016). **Uva Concord: Ampelografia da cultivar copa de videira Concord**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-imagens/-/midia/3134002/uva-concord>> Acesso em: 30 out. 2020.

EMBRAPA (2016). **Uva Isabel: Ampelografia da cultivar copa de videira Isabel**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-imagens/-/midia/3136002/uva-isabel>> Acesso em: 30 out. 2020.

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

EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Fresh Food in Brazil**. Fev 2020. Disponível em: <<https://www.euromonitor.com/fresh-food-in-brazil/report>> Acesso em: 13 out 2020.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Mol. Biol.** 2002, 48, 155.

FIGUEIRA, R. et al. **Análise isotópica (^{13}C) e legalidade em néctares de uva**. Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v. 28, n. 2, p. 233-246, 2010.
FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**. Portugal, Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. 3. ed. Porto Alegre: Renascença, 2008.

GRANDIZOLI, C. W. P. D. S. et al. Grape juice quality control by means of ^1H nmr spectroscopy and chemometric analyses. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1227–1232, 2014.

GURAK, P. D. et al. Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. **Journal of Engineering**. London, v. 96, n. 3, p. 421-426, Fev 2010.

HENRIQUE, P. C. **Radiação Ultravioleta (UV-C) em sucos de uva integral**. 2015. 93 f. Tese (doutorado) – Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 16 out. 2020.

International Organisation of Vine and Wine (OIV). **2019 Statistical report on world vitiviniculture**. 23 p. 2019.

JOHNSON, H. Vintage: The Story of Wine. **Simon & Schuster**, New York. 1989.

KLIEWER, W. M. Sugars and Organic Acids of *Vitis vinifera*. **Plant Physiology**, v. 41, n. 6, p. 923–931, 1966.

KOVALESKI, Adalécio; et al. Maçã: o produtor pergunta a Embrapa responde. **Coleção 500 perguntas 500 respostas**. 229 p. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2013.

KOWALSKI, B. R.; SEASHOLTZ, M. B. Recent developments in multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**. 1991, 5, 129.

LEA, A. G.; ARNOLD, G. M. The phenolics of ciders: bitterness and astringency. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 29, n. p. 478-483, 1978.

LENZ, E. M.; WILSON, I. D. J. **Proteome Res**. 2007, 6, 443.

LI, Shubo; TIAN, Yufeng; JIANG, Pingyingzi; LIN, Ying; LIU, Xiaoling; YANG, Hongshun. Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** (2020).

LIU, H. et al. Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by

- principal component analysis. v. 1536, n. April 2005, p. 1526–1536, 2006.
- MAIA, J. D. C.; CAMARGO, U. A. **Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil**. 2005. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, 2005.
- MATO, I.; SUÁREZ-LUQUES, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, Kidlington, v. 43, n. 10, p. 1175-1188, Dec. 2005.
- MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.**, v. 35, p. 341-371, 1995.
- MELO, M. R. Loiva. Vitivinicultura brasileira: panorama 2018. **Comunicado técnico 210**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, out. 2019.
- MIAW, C. S. W. **Detecção de fraudes em néctares de frutas: Análises espectroscópicas aliadas a métodos de calibração e classificação multivariada**. 2018. 196 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2018.
- MIELE, A. et al. Uva: o produtor pergunta a Embrapa responde. **Coleção 500 perguntas 500 respostas**. 208 p. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2008.
- Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14, de 08 de Fevereiro de 2018. 27 f. 2018.
- MONAKHOVA, Y. B. et al. Validation studies for multicomponent quantitative NMR analysis: The example of apple fruit juice. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 19, n. 1, p. 17–29, 2014.
- MORAIS, D. C. M., et al. Análise de compostos fenólicos totais e Atividade antioxidante de casca e polpa de Maçã e suas respectivas farinhas. **Revista Desafios** – v. 6, Especial, 2019.
- NASCIMENTO, Claudia. **Ressonância Magnética Nuclear**. Blucher. 120 p. 2016.
- NASCIMENTO, E. S. P. **"Análise Metabolômica via RMN: Amostras de urina e látex"**. 2011. 172 f. Tese (doutorado) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2011.
- NAVARRO, Y. et al. Use of NMR for the Analysis and Quantification of the Sugar Composition in Fresh and Store-Bought Fruit Juices. **Journal of Chemical Education**, v. 97, n. 3, p. 831–837, 2020.
- NETO, J.M.N. MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**. 1998; 21(4):467-469.
- NOGUEIRA, A. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. Publ. UEPG **Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, Ponta Grossa, 9(3): 7-14, dez. 2003.

O'DONNELL C. P. et al. (eds.), *Process Analytical Technology for the Food Industry*, Food Engineering Series, **Springer Science Business Media**, New York, 2014.
OIV. Métabolismes primaires : les acides organiques. p. 1–6, 2007.

OLIVEIRA, B. G. et al. Controlling the quality of grape juice adulterated by apple juice using ESI (-) FT-ICR mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 149, n. April, p. 104033, 2019.

PAGANINI, C. et al. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1336-1343, 2004.

PAULI, G. F. QNMR - A versatile concept for the validation of natural product reference compounds. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n. 1, p. 28–42, 2001.

PIRILLO, C. P.; SABIO, R. P. 100% Suco: Nem tudo é suco nas bebidas de frutas. **Hortifruti Brasil**, 2019. p. 6-13.

PROCTOR, W. G.; YU, F. C. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. **Physical Review**, v. 77, n. 5, p. 717, 1950.

PUTRI, S. P.; YAMAMOTO, S.; TSUGAWA, H.; FUKUSAKI, E. **J. Biosci. Bioeng.** 2013, 116, 9.

RIBÉREAU-GAYON, G. Étude des mécanismes de synthèse et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique chez *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**, v. 7, n. 9, p. 1471–1482, 1968.

RIZZON, L. A. **Metodologia para análise de mosto e suco de uva**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 750–756, 2005.

RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. **Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS**. p. 911–914, 2007.

ROSA, S. M. **Terroir do Brasil**. Disponível em:
<https://revistaadega.uol.com.br/artigo/uvas-dos-terroirs-do-brasil_9773.html>.
Acesso em: 27 out. 2020.

RINKE, P. Tradition Meets High Tech for Authenticity Testing of Fruit Juices. In: DOWNEY, G. **Advances in Food Authenticity Testing**: Elsevier, 2016. p. 625-665.

RIZZON, L. A., BERNARDI, J., MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã gala, Golden delicious e fuji¹. **Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(4): 750-756, out.-dez. 2005.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Suco de uva. **Coleção Agroindústria Familiar**. 45 p. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2007.

ROMBALDI, V. Cesar; et al. Produtividade e qualidade de uva, cv. Bordô (ives), sob dois sistemas de cultivo. **R. bras. Agrociência**, v.10, n. 4, p. 519-521, out-dez, 2004.

SANTANA, João Mábio. **O uso da ressonância magnética nuclear na análise do perfil químico de sucos de uva do tipo integral e néctar**. 2017. 169 f. Tese (doutorado) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

SAPIENZA, L. et al. H NMR-Based Metabolomics Reveals a Pedoclimatic Metabolic Imprinting in Ready-to-Drink Carrot Juices. 2016.

SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in Plant Metabolomics: Techniques, Problems and Prospects. **Phytochemical Analysis**, 21:14-21. 2010.

SENADO FEDERAL. **Código de Defesa do Consumidor e Normas Correlatas**. 2ª edição, Brasília, 2017.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals, functional foods and dietary supplements in health and disease. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. 1, p. 226-230, 2012.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic, 1995, 331 p.

SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R.; REGE, D. V. Fruit and Vegetable Products. In: **Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity**: England: Woodhead Publishing, 1997. p. 77-130.

SOBOLEV, Anatoly et al. Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. In: **Trends in Food Science & Technology**: Elsevier. v. 91, p. 347-353, 2019.

SPINELLI, F. R. et al. Detection of addition of apple juice in purple grape juice. **Food Control**, v. 69, p. 1–4, 2016.

SORIA, A. et al. Chromatographic Technique: Gas Chromatography (GC). In: SUN, D.W. **Modern Techniques for Food Authentication**, Hardbound: Academic Press, 2008, p. 321-359.

SPINELLI, R. F. **Validação de métodos para detecção da adição de suco de maçã em sucos de uva**. 2013. 82 f. Dissertação (mestrado) - Biotecnologia e Gestão Vitivinícola, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.

TECCHIO, F. M.; MIELLE, A.; RIZZON, L. A. Composição físico-química do vinho Bordô de Flores da Cunha, RS, elaborado com uvas maturadas em condições de baixa precipitação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, set./out. 2007.

TOMASSINI, A. et al. H NMR-Based Metabolomics Reveals a Pedoclimatic Metabolic Imprinting in Ready-to-Drink Carrot Juices. 2016.

VENÂNCIO, T. et al. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation times in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, n. 1, p. 34-39, 2005.

YANG, D. Y.; KAKUDA, Y.; SUBDEN, R. E. Higher alcohols, diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol biosynthesis in grapes undergoing carbonic maceration. **Food Research International**, v. 39, n. 1, p. 112–116, 2006.

ZANCHIM, M. C. et al. Consumption of dietary intake markers by patients with diabetes assessed using a mobile application. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 12, p. 4199–4208, 2018.

ZANDONÁ, P. Giovana. **Produção de suco de maçã com pequenos frutos (amora, framboesa e morango): aspectos físico-químicos, bioativos e sensoriais**. 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

ZHANG, Y.; BUTELLI, E.; MARTIN, C. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 81–90, 2014.