



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO

Amanda Meloto Sachetti

**QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES EM SUCOS DE FRUTA UTILIZANDO
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H**

Brasília – DF

2023

Amanda Meloto Sachetti

QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES EM SUCOS DE FRUTA UTILIZANDO
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília como requisito
parcial para conclusão do curso de
Bacharelado em Química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Aline Lima de
Oliveira Paterno

Brasília – DF

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S121q Sachetti, Amanda Meloto
Quantificação de açúcares em sucos de fruta utilizando
ressonância magnética nuclear de 1H / Amanda Meloto
Sachetti; orientador Aline Lima de Oliveira Paterno. --
Brasília, 2023.
74 p.

Monografia (Graduação - Química Bacharel) -- Universidade
de Brasília, 2023.

1. açúcar. 2. suco. 3. RMN. I. Paterno, Aline Lima de
Oliveira, orient. II. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marta e Luciano, que acreditaram em mim e sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, aos meus pais pelo incentivo, apoio e amor incondicional.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno, pela oportunidade, confiança, orientação e por todos os ensinamentos.

Ao doutor Luiz Eduardo pela ajuda, paciência e conhecimentos transmitidos durante esse trabalho.

Aos meus amigos pelas risadas, amizade e apoio.

A todos que fizeram parte da minha formação e contribuíram para a realização desse TCC.

RESUMO

A alimentação saudável está se tornando cada vez mais popular à medida que a preocupação das pessoas com seu bem-estar tem aumentado. Ela se baseia no consumo de alimentos que atendam todas as necessidades do corpo, garantindo, assim, uma boa saúde e um peso ideal, além de diminuir os riscos de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Assim, a demanda por alimentos menos industrializados e contendo menor quantidade de açúcares, conservantes e aditivos tem crescido. Isso pode ser observado pelo aumento no consumo de sucos, bebidas de frutas produzidas sem adição de água, açúcar ou aditivos. Devido às severas consequências que o excesso de açúcar pode causar à saúde humana, a sua determinação em alimentos passou a ser matéria de diversos estudos e pesquisas. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido muito utilizada para analisar e quantificar substâncias presentes em alimentos, principalmente os açúcares. Assim, o objetivo desse Trabalho de Conclusão de Curso foi utilizar análises de RMN quantitativo de ^1H (RMNq de ^1H) para identificar e quantificar os açúcares frutose, glicose e sacarose em amostras de sucos de uva e maçã, além de compará-las com duas amostras de bebidas adoçadas. Foi possível identificar e quantificar os açúcares, frutose, sacarose, α -glicose e β -glicose, em sucos integrais, 100% e bebidas adoçadas de maçã e uva de diferentes marcas, utilizando-se a sequência de pulso noesygppr1d. Os teores de açúcar determinados estavam abaixo dos valores indicados nos rótulos das bebidas estudadas. Cabe destacar que não foi detectada a presença de sacarose na composição dos sucos de uva, entretanto na bebida adoçada dessa fruta encontrou-se alto teor desse carboidrato, indicando que este foi utilizado para adoçá-la. Por fim, foi empregada a técnica de refratometria para comparação com os resultados alcançados pela técnica de RMNq de ^1H e com os rótulos dos produtos. Os teores obtidos através da técnica de refratometria se aproximaram mais dos dispostos nos rótulos, entretanto essa técnica não é específica apenas para os açúcares, pois leva em conta todos os sólidos presentes nas bebidas. Portanto, a técnica de RMNq de ^1H mostrou-se mais específica, pois possibilita identificar e quantificar os açúcares em uma amostra de maneira simultânea, além de determinar o teor de outros componentes do suco.

Palavras-chave: açúcar, suco, RMN, glicose, frutose, sacarose

ABSTRACT

Healthy eating is becoming more and more popular as people's concern for their well-being has increased. It is based on the consumption of foods that meet all the body's needs, thus ensuring good health and an ideal weight, in addition to reducing the risks of developing non-communicable chronic diseases. Thus, the demand for less industrialized foods and containing less sugar, preservatives, and additives has grown. This can be observed by the increase in the consumption of juices, fruit drinks produced without the addition of water, sugar or additives. Due to the severe consequences that excess sugar can cause to human health, its determination in foods has become the subject of several studies and research. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) has been widely used to analyze and quantify substances present in foods, mainly sugars. Thus, the objective of this Course Completion Work was to use quantitative ^1H -NMR (^1H qNMR) to identify and quantify the sugars fructose, glucose, and sucrose in samples of grape and apple juices, in addition to comparing them with two samples of sweetened beverages. It was possible to identify and quantify the sugars fructose, sucrose, α -glucose and β -glucose in whole juices, 100% and sweetened apple and grape drinks from different brands, using the noesygppr1d pulse sequence. The determined sugar contents are below the values indicated on the labels of the drinks studied. It should be noted that the presence of sucrose in the composition of grape juice was not detected, however in the sweetened drink of this fruit a high content of this carbohydrate was found, indicating that it was used to sweeten it. Finally, the refractometry technique was used for comparison with the results achieved by the ^1H -qNMR technique and with the product labels. The levels obtained through the refractometry technique were closer to those shown on the labels, however this technique is not specific only for sugars, as it considers all the solids present in the beverages. Therefore, the ^1H -qNMR technique proved to be more specific, as it makes it possible to identify and quantify the sugars in a sample simultaneously, in addition to determining the content of other components of the juice.

Keywords: sugar, juice, NMR, glucose, fructose, sucrose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de poli-hidroxialdeído e poli-hidroxiketona	17
Figura 2 - Ilustração dos enantiômeros D e L da galactose	17
Figura 3 - Forma cíclica da D-glicose e D-frutose	18
Figura 4 - Formas cíclicas α e β da D-glicose	19
Figura 5 - Formação de uma ligação glicosídica	19
Figura 6 - Frutose	20
Figura 7 - Glicose	21
Figura 8 - Sacarose	22
Figura 9 - Reação do método de Fehling	26
Figura 10 - Representação dos níveis de energia dos núcleos de hidrogênio	29
Figura 11 - Representação de um núcleo em precessão	30
Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da amostra 1m sem supressão do sinal da água em 10% D_2O	41
Figura 13 - Comparação entre os espectros de RMN de ^1H (600 MHz) das sequências de supressão do sinal da água em 10% D_2O	42
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da amostra 1m em 10% D_2O . Os sinais utilizados nas análises quantitativas estão indicados com letras	44
Figura 15 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) dos sucos de (A) maçã e (B) uva em 10% D_2O	45
Figura 16 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) das amostras 1u e 4u em 10% D_2O	45
Figura 17 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) das amostras 5m e 4u (bebidas adoçadas) em 10% D_2O	46
Figura 18 - Gráfico da quantidade de açúcares das amostras	48
Figura 19 - Teores de etanol das amostras analisadas	49
Figura 20 - Gráfico da comparação dos teores de etanol nas amostras	51
Figura 21 - Gráficos dos teores de açúcares totais nas amostras	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de sucos analisadas.....	36
Tabela 2 - Ingredientes nas amostras.....	37
Tabela 3 - Atribuições dos sinais de RMN usados para quantificação.....	43
Tabela 4 - Resultados das quantidades de açúcares e etanol nas amostras	47
Tabela 5 - Resultados das quantidades de açúcares e etanol nas amostras do teste de estabilidade	50
Tabela 6 - Teores de açúcares totais obtidos por refratometria e RMNq	53
Tabela 7 - Comparação das quantidades de açúcares totais obtidas por RMNq, refratometria e rótulo das bebidas.....	54
Tabela 8 - Comparação entre os valores de açúcares totais obtidos a partir das técnicas de RMNq e refratometria e o rótulo.....	55

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C	Carbono
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cu	Cobre
DMS	Dimetilsulfona
ERETIC	<i>Electronic REference To access In vivo Concentrations</i>
H	Hidrogênio
IV	Infravermelho
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMNq	Ressonância Magnética Nuclear quantitativa
T ₁	Tempo de relaxação longitudinal
T ₂	Tempo de relaxação transversal
TSP	Ácido trimetilsililpropanóico
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Sucos	12
2.2. Açúcares	16
2.2.1. Frutose, glicose e sacarose	20
2.2.2. Excesso no consumo de açúcares	22
2.3. Ressonância Magnética Nuclear	28
2.3.1. RMN quantitativo	31
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos Específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Amostras	36
4.2. Preparo de amostra	37
4.3. Preparo da referência externa	38
4.4. Teste de estabilidade das amostras	38
4.5. Análise por RMN	38
4.6. Quantificação dos sinais dos espectros	39
4.7. Refratometria	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Supressão do sinal da água	41
5.2. Atribuição dos sinais de RMN	43
5.3. Quantificação dos açúcares e etanol das amostras por RMN de ¹ H	46
5.4. Teste de estabilidade das amostras	50
5.5. Refratometria	52
5.6. Comparação com os rótulos das bebidas	54
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

A alimentação saudável, aquela que garante a ingestão de nutrientes necessários para o organismo por meio de alimentos variados, está, cada vez mais, sendo preferida devido à crescente preocupação das pessoas com a saúde. Ela garante um peso saudável e reduz a chance de obesidade e sobrepeso, além de diminuir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Essa alimentação atende todas as necessidades do corpo, fornecendo os nutrientes, vitaminas e minerais necessários e garantindo um bom funcionamento do organismo, uma boa saúde e boa qualidade de vida. (OPAS, 2019; UNIMED, 2017)

Assim, a mudança nos hábitos alimentares dos consumidores levou a maior procura por alimentos mais saudáveis e nutritivos, menos processados industrialmente e contendo menor quantidade de conservantes e aditivos, ingrediente não nutritivo adicionado visando conservar ou modificar alguma característica do alimento, como acidulantes, corantes, aromatizantes, espessantes e conservantes. Essas mudanças levaram também a procura por alimentos com menor quantidade de açúcar, devido aos problemas causados pelo seu excesso. Dentre esses alimentos, foi observado um aumento no consumo de sucos concentrados. Em 2019, foram produzidos no Brasil, 32 bilhões de litros de bebidas não alcoólicas, que incluem chás, águas, energéticos, isotônicos, sucos, refrigerantes e outras, correspondendo a aumento de 3,5% em comparação com o ano anterior. Nesse mesmo ano, a produção de sucos cresceu 6,9% e o consumo per capita de sucos concentrados foi de 2,49 litros. (ABIR, 2021)

A ingestão excessiva de açúcar pode trazer consequências à saúde que vão desde cáries dentárias até ganho de peso que pode levar a obesidade. De acordo com a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica, foi identificado que no ano de 2019, 19,8% da população Brasileira apresentou quadros de obesidade e 55,4% sobrepeso (ABESO, 2020). A obesidade está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de outras doenças como diabete, hipertensão, doenças cardiovasculares e outras. Devido às severas consequências que o excesso de açúcar pode causar à saúde humana, a determinação da quantidade de açúcar em alimentos passou a ser matéria de diversos estudos e pesquisas. (WHO, 2015; GAINO

e SILVA, 2015)

Para a determinação da quantidade de açúcar em alimentos e bebidas podem ser utilizadas diversas técnicas. Atualmente, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido muito usada para quantificação e identificação de açúcar, ácidos e outras substâncias presentes em comidas e bebidas, com o objetivo de atestar a veracidade das informações dispostas nos seus rótulos e detectar não conformidades. É uma técnica rápida, precisa e exata, que não necessita de muitos preparos de amostra e não utiliza um material de referência contendo o analito. (NAVARRO *et al.*, 2020)

Assim, esse trabalho tem o objetivo de quantificar os açúcares presentes em sucos de frutas utilizando o método de RMN de ^1H . Pela legislação brasileira, sucos são bebidas produzidas apenas a partir de frutas ou legumes, sem adição de água, açúcar ou qualquer outro aditivo. Os néctares e refrescos são bebidas de frutas obtidas por uma diluição em água e se diferenciam pela quantidade de polpa presente, sendo que o néctar apresenta maior porcentagem de polpa que o refresco, além disso, é permitido a adição de açúcar nesses dois tipos de bebidas. (PIRILLO e SABIO, 2009). Serão analisados sucos e bebidas adoçadas de uva e maçã, utilizando a técnica de RMN de ^1H para identificação e quantificação dos açúcares: frutose, glicose e sacarose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sucos

A legislação brasileira define suco como:

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. (BRASIL, 1994, p. 2)

A norma proíbe a adição de corantes, aromas artificiais e substâncias que não são provenientes da fruta ou do vegetal que compõe o suco. Entretanto, é permitido adição de, no máximo, 10% em peso de açúcar devendo estar indicado no rótulo como “suco adoçado”. Além disso, essas bebidas devem ser compostos apenas pelo suco da fruta, sendo vetada a sua diluição em água, exceto em alguns casos, como os sucos tropicais, sucos de abacaxi, manga, maracujá, cajá, caju, goiaba e outros. (BRASIL, 1994, 2003a, 2009)

Os sucos ainda podem ser classificados como: i - integral, quando não é acrescentado açúcar ou água; ii - suco tropical, obtido pela dissolução em água da polpa de uma fruta tropical; iii - desidratado, sendo o suco obtido pela desidratação do suco integral, tornando-o sólido; iv - reconstituído, obtido pela diluição do suco desidratado ou concentrado até obter a concentração original do suco integral. (BRASIL, 1994, 2003a, 2009)

No mercado brasileiro podem ser encontradas três tipos de bebidas de fruta: suco, néctar e refresco. Apesar de muitas vezes serem todas nomeadas apenas como suco, existem diferenças entre elas, sendo a principal, a porcentagem de suco da fruta presente. Os sucos devem conter 100% do suco da fruta, como dito acima, enquanto os néctares são bebidas obtidas pela diluição em água do suco com adição de açúcar, sendo necessário no mínimo 30% de massa de suco ou polpa da fruta, com algumas exceções. Já os refrescos são bebidas feitas pela diluição em água do suco ou polpa da fruta, podendo ou não ter acréscimo de açúcar. Nesse caso, a quantidade de polpa de fruta mínima obrigatória alterna dependendo da fruta utilizada e a média exigida pela legislação varia entre 10% e 20%. Todas as bebidas de fruta podem ser formadas por apenas uma fruta ou por uma mistura de frutas e até legumes, chamadas bebidas mistas, por exemplo, alguns sucos de uva podem conter também suco de maçã, com

o objetivo de torná-los mais doce. (BRASIL, 1994, 2003a, 2009)

A composição química das frutas depende, principalmente, do seu tipo e seu grau de maturação, porém a maior parte das frutas é composta por água. Os outros componentes que estão presentes são os carboidratos, geralmente frutose, sacarose e glicose e uma pequena quantidade de vitaminas, além de ácidos e substâncias aromáticas dependendo do tipo de cada fruta. Em laranjas, limões e tangerinas, por exemplo, predomina o ácido cítrico. (NAVARRO *et al.* 2020)

O Ministério da Saúde, por meio de leis e regulamentos, estabeleceu obrigatoriedade de apresentação de rótulos com informações detalhadas sobre o produto, fabricante, ingredientes, valores nutricionais e quaisquer outras informações necessárias, para todos os produtos vendidos embalados. Essas normas permitem ainda que o suco seja identificado como integral quando não houver adição de açúcar ou água, em contrapartida, é obrigatório indicar o produto como “adoçado” em caso de sucos e refrescos com acréscimo de açúcar. Nos refrescos e néctares deve-se apresentar a porcentagem de suco ou polpa de fruta. (BRASIL, 2002, 2003b, 2009)

Define-se por ingredientes todas as substâncias usadas no preparo da bebida que devem ser listadas em ordem decrescente de quantidade, de forma que os primeiros ingredientes sejam os que estão em maior concentração no produto. Além dos ingredientes, é obrigatória a apresentação da tabela nutricional, que tem por objetivo informar o consumidor das propriedades nutricionais do alimento, o valor energético, quantidade de carboidratos, gorduras, proteínas e sódio. (BRASIL, 2003b, 2009)

Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu novas regras que entraram em vigor em outubro de 2022 sobre a rotulagem dos alimentos embalados. A tabela nutricional foi modificada para facilitar sua visualização e entendimento, além da obrigatoriedade de incluir nela a quantidade de açúcares totais e adicionados. A principal mudança foi a nova rotulagem frontal que indica a presença de alto teor de açúcar adicionado e/ou gordura saturada e/ou sódio naquele alimento. (BRASIL, 2020)

Um dos problemas enfrentados com alimentos é a adulteração que pode

ocorrer pela substituição de algum ingrediente de alto custo por outro de menor, pela adição de alguma substância para melhorar a qualidade, pela remoção de um ingrediente sem avisar o consumidor e, até mesmo, pela contaminação. Nos sucos, as adulterações mais frequentes são: adição de água, açúcares, extratos secundários de frutos e corante, entre outros. Sacarose, xarope de milho rico em frutose, açúcar invertido são os açúcares que costumam ser acrescentados aos sucos. (SILVA *et al.*, 1999)

Silva e colaboradores, em 1999, publicaram uma revisão sobre a adulteração em sucos de frutas pela adição de açúcares. A principal adulteração identificada foi a adição de açúcares a essas bebidas, podendo ser na forma de sacarose, xarope de milho rico em frutose, açúcar invertido de cana ou de beterraba. Foram apresentados três métodos para analisar as amostras: perfil de açúcares majoritários; perfil de oligossacarídeos e relação entre os isótopos estáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio. (SILVA *et al.*, 1999)

O perfil de açúcares majoritários detecta a proporção total deles, obtendo a relação entre a quantidade de glicose, frutose e sacarose, possibilitando a identificação de adulterações por adição de um desses açúcares em uma proporção diferente da presente no suco, descoberta através de pesquisa prévia ou dados da literatura, ou por adição de outro tipo de adoçante. (SILVA *et al.*, 1999)

Para a análise do perfil dos oligossacarídeos foram utilizadas as cromatografia: em placa, líquida com detecção amperométrica e gasosa capilar com detecção por ionização de chama, porém os oligossacarídeos podem ser hidrolisados quando aquecidos ou armazenados por muito tempo, acusando, assim, um falso negativo, sendo essa a principal limitação da análise do perfil dos oligossacarídeos. (SILVA *et al.*, 1999)

O método isotópico é principalmente usado para determinar a origem do açúcar, através da espectroscopia de massas e da ressonância magnética nuclear (RMN), pode-se usar as razões entre os isótopos dos átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio. Empregando os isótopos de carbono, é possível determinar se o açúcar invertido adicionado é originado em plantas (milho ou cana-de-açúcar) ou frutas, pela diferença da razão desses isótopos presente devido à fixação do dióxido de carbono

que ocorre por ciclos fotossintéticos diferentes. Analisando a razão entre os isótopos de oxigênio há a possibilidade de determinar se foi adicionada água no suco, pois a água absorvida pelas plantas tem uma razão isotópica diferente da água do solo, a água das plantas é mais enriquecida de oxigênio-18. E a taxa de hidrogênio irá determinar se foi adicionado açúcar de beterraba pela análise do etanol formado pela fermentação do açúcar, além de determinar a adição de água nos sucos. Assim, demonstrou-se que existem vários métodos possíveis para identificar adulterações em sucos e cada um dos parâmetros irá possibilitar a análise de um tipo de adulteração diferente. (SILVA *et al.*, 1999)

Outro estudo, realizado por Debiasi, utilizou a RMN de ^1H para averiguar a qualidade dos sucos e determinar a possibilidade de detectar adulterações nessas bebidas. Para isso, foram utilizados padrões dos açúcares: glicose, frutose e sacarose e amostras de sucos integrais e néctares de uva e maçã. (DEBIASI, 2020)

Nesse trabalho, em quase todas as 24 amostras analisadas foi detectado etanol, podendo ser devido ao processo de fermentação residual, ao tempo de armazenamento ou condições de acomodações das bebidas após abertas. Entre os sucos analisados, o suco integral obteve o sinal mais intenso. Também, foram identificados ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, glicose e frutose, substâncias presentes na fruta, assim, esperadas de serem encontradas em baixas concentrações nos sucos. (DEBIASI, 2020)

Ao comparar o néctar com o suco integral de uva observou-se que o néctar, diferente da bebida integral, apresentava sacarose em sua composição, representada pelos sinais de RMN de ^1H em 5,28 ppm e 4,08 ppm da sacarose. Deste modo, a presença de sacarose em sucos integrais de uva, pode significar fraude por adição desse açúcar, pois a sacarose é convertida em frutose e glicose durante a maturação da fruta, sendo assim, não deve estar presente nos sucos integrais. Assim, Debiasi mostrou ser possível identificar açúcares em sucos utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear e potenciais adulterações em sucos integrais de uva pela adição de sacarose. (DEBIASI, 2020)

2.2. Açúcares

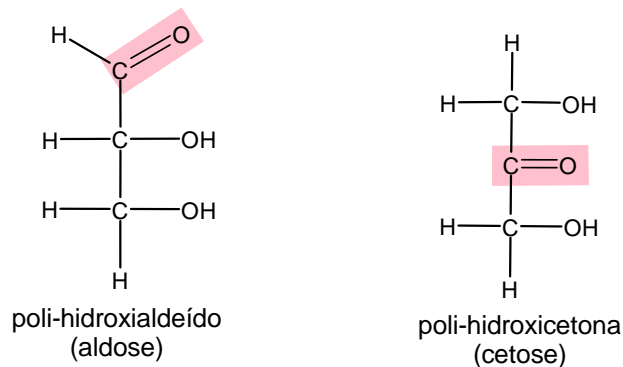
De acordo com Manhani e colaboradores (2014, p. 4): “o açúcar é um termo genérico utilizado para carboidratos cristalizados comestíveis [...]”. Os açúcares são encontrados na forma de glicose, frutose, galactose, sacarose, lactose e maltose. (MANHANI *et al.*, 2014)

Carboidratos são moléculas compostas principalmente por carbono, oxigênio e hidrogênio e são divididos em duas classes: carboidratos simples e carboidratos complexos. Os simples são os monossacarídeos, as menores unidades de carboidrato, não podendo ser hidrolisadas em carboidratos menores, também são conhecidos como açúcares ou sacarídeos. Os carboidratos complexos são formados por dois ou mais monossacarídeos, sendo que os constituídos por dois açúcares são os dissacarídeos, os oligossacarídeos são aqueles que contém de três a dez monossacarídeos e os polissacarídeos compostos por mais de dez unidades. Os carboidratos complexos podem ser hidrolisados, quebrando sua estrutura na quantidade correspondente de monossacarídeos que os compõem. (RAO *et al.*, 2019; BARREIROS e BARREIROS, 2012)

Os carboidratos são responsáveis por uma porção significativa da dieta humana, atuam como fonte de energia química para os organismos vivos e participam da formação dos ácidos nucleicos. Para os vegetais e alguns animais, funcionam como constituinte de tecidos de suportes, como a celulose, carboidrato mais abundante na natureza. Também, existem várias aplicações industriais, como o amido, muito utilizado na fabricação de pães e massas e os mono e oligossacarídeos, como glicose, frutose e sacarose, que são usados como adoçantes. Os carboidratos também são utilizados pelas indústrias farmacêuticas para produção de medicamentos. (RAO *et al.*, 2019)

Os monossacarídeos ou açúcar simples são representados pela fórmula empírica $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ou $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$, por isso, são conhecidos como hidratos de carbono e podem ser encontrados na forma de poli-hidroxialdeído (aldose), se conter um grupo aldeído, ou poli-hidroxicetona (cetose), se conter um grupo cetona, como ilustrado na Figura 1. Os monossacarídeos acíclicos não são ramificados e contém grupos hidroxila ligadas a cada carbono, com exceção da carbonila. (RAO *et al.*, 2019; BARREIROS e BARREIROS, 2012)

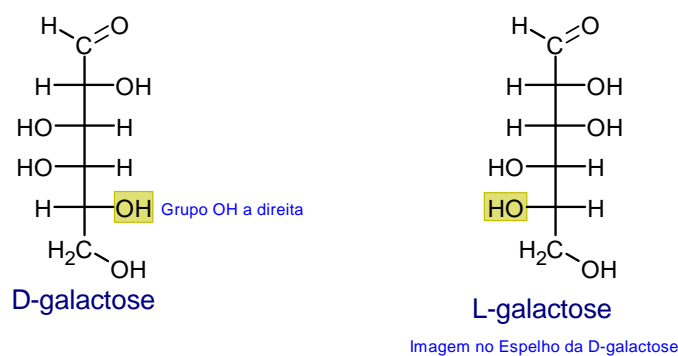
Figura 1 - Exemplos de poli-hidroxialdeído e poli-hidroxicetona



Fonte: BARREIROS e BARREIROS, 2012

São também nomeados segundo o número de carbonos na molécula: três carbonos chama-se triose, quatro carbonos é nomeado tetrose e assim por diante. Para representar a estereoquímica dos carboidratos utilizam-se as projeções de Fischer, o grupo carbonila é colocado no topo ou o mais próximo possível, então será designado D ou L pela configuração do carbono assimétrico mais distante da carbonila. Se a hidroxila ligada a esse carbono estiver à direita o carboidrato pertencem à classe D e se estiver à esquerda ele será da classe L, assim os açúcares D e L são enantiômeros (Figura 2). Apesar disso, na natureza, a maioria dos açúcares encontrados estão na configuração D. (RAO *et al.*, 2019; BARREIROS e BARREIROS, 2012)

Figura 2 - Ilustração dos enantiômeros D e L da galactose

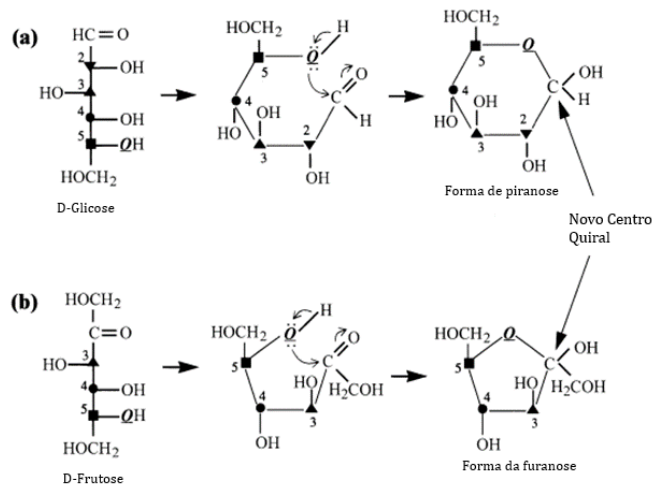


Fonte: adaptada de BARREIROS e BARREIROS, 2012

Os monossacarídeos com quatro ou mais átomos não costumam ser encontrados na forma de cadeia aberta, eles tendem a formar um hemiacetal cíclico, composto que apresenta um grupo álcool e um éter ligados ao mesmo carbono formado pela reação entre um aldeído ou cetona e um álcool, no caso dos monossacarídeos, ocorre uma reação intramolecular, pois a carbonila e o álcool estão

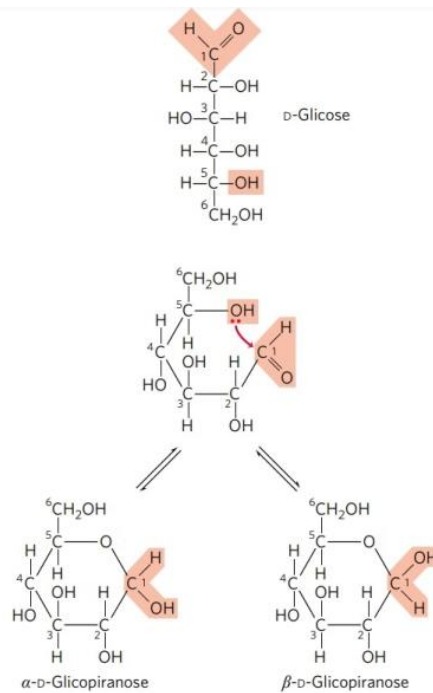
na mesma molécula. Por exemplo, na D-glicose, a hidroxila no carbono 5 reage com aldeído no carbono 1, formando um anel de seis membros, chamado piranose. Isso também ocorre com a D-frutose, porém o álcool no carbono 5 reage com a carbonila no carbono 2, gerando um anel de cinco átomos, denominado furanose (Figura 3). (RAO *et al.*, 2019; BARREIROS e BARREIROS, 2012)

Figura 3 - Forma cíclica da D-glicose e D-frutose



Fonte: adaptada de RAO *et al.*, 2019

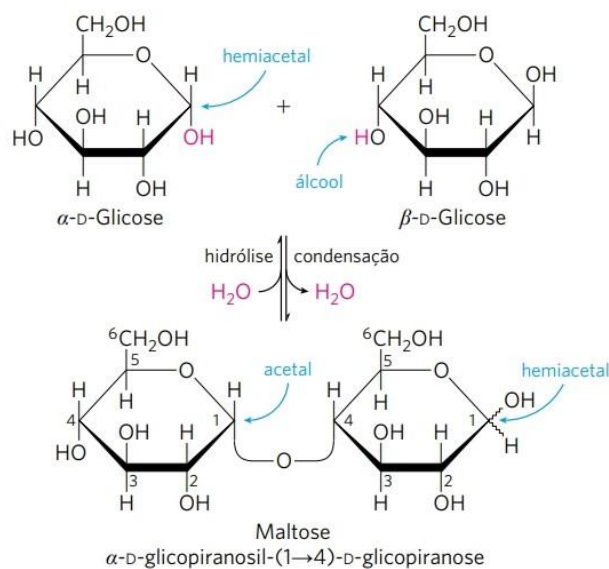
Conforme pode-se observar na figura 3, a ciclização do monossacarídeo gera um novo centro assimétrico no carbono 1, chamado de carbono anomérico, aquele que estava ligado a carbonila anteriormente. Devido a esse novo centro quiral, duas formas cíclicas são possíveis de ocorrer, dois diastereoisômeros, chamados de anômeros, diferenciados pela configuração do carbono anomérico e serão nomeados α ou β , dependendo da posição da hidroxila do carbono 1 em relação ao grupo OH do carbono 5. Se eles estiverem *cis*, será designado β , se estiverem *trans* um ao outro será designado α (Figura 4). As formas α ou β do mesmo monossacarídeo terão propriedades químicas, físicas e biológicas diferentes. (RAO *et al.*, 2019; BARREIROS e BARREIROS, 2012)

Figura 4 - Formas cíclicas α e β da D-glicose

Fonte: adaptada de NELSON e COX, 2019

Os dissacarídeos são dois monossacarídeos ligados covalentemente por uma ligação glicosídica, ligação formada quando uma hidroxila de um dos monossacarídeos reage com o carbono anomérico do outro, formando um acetal. Quando é formada essa ligação, um dos açúcares irá perder um hidrogênio e o outro um radical hidroxila, liberando uma molécula de água (Figura 5).

Figura 5 - Formação de uma ligação glicosídica



Fonte: NELSON e COX, 2019

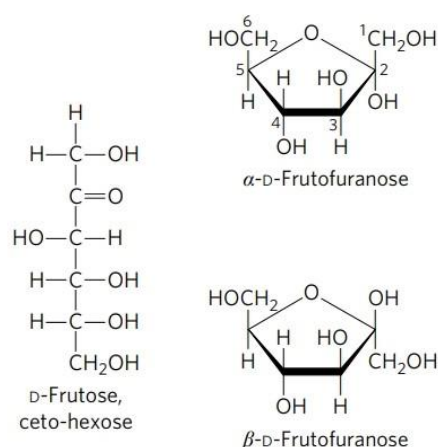
2.2.1. Frutose, glicose e sacarose

Os açúcares estudados neste trabalho são a frutose, a glicose e a sacarose. Todavia, cabe ressaltar que existem outros açúcares que não serão o foco nesse trabalho e, desta forma, não serão abordados.

A frutose é uma ceto-hexose, um monossacarídeo com seis carbonos e com um grupo cetona no carbono 2, com fórmula química $C_6H_{12}O_6$. Sua forma cíclica é um anel de cinco membros, chamado D-Frutofuranose com dois anômeros, α e β (Figura 6). Além de ser um componente de frutas e vegetais, também é sintetizada no organismo a partir do sorbitol. Pode ser utilizada para substituir a glicose em dietas de pessoas com diabetes, devido a sua estrutura se assemelhar a da glicose, mas não necessita da insulina para ser metabolizada. (NELSON e COX, 2019; BARREIROS, BOSSOLAN e TRINDADE, 2005)

A frutose costuma ser muito utilizada como adoçante em bebidas e alimentos por ser cerca de 1,7 vezes mais doce que a sacarose e mais solúvel. O mel é o produto com maior concentração de frutose, 41%, e, por esse motivo, é classificado como um adoçante natural. (BARREIROS, BOSSOLAN e TRINDADE, 2005; GAINO e SILVA, 2015)

Figura 6 - Frutose

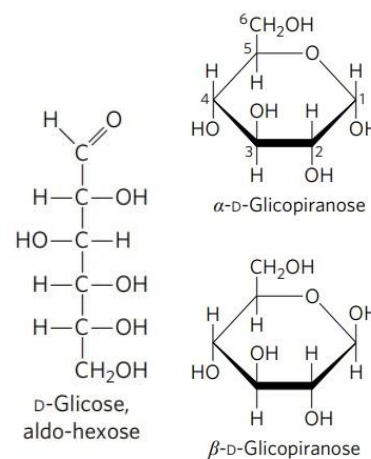


Fonte: NELSON e COX, 2019

A glicose é uma aldo-hexose, um monossacarídeo de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ e que se arranja em um anel de seis membros chamado D-Glicopiranosose

(Figura 7). É considerada uma das principais fontes de energia do corpo, sendo que o cérebro absorve mais da metade da glicose consumida para produzir energia. Além disso, é um dos produtos da fotossíntese e responsável por iniciar a respiração celular nos procariontes e eucariontes, além de participar de outras vias metabólicas. (NELSON e COX, 2019)

Figura 7 - Glicose

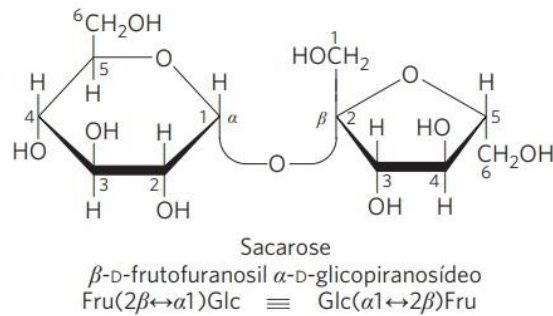


Fonte: NELSON e COX, 2019

A sacarose, também chamada de açúcar de mesa, é um dissacarídeo composto por dois monossacarídeos, a D-frutose e D-glicose, ligados entre si por uma ligação glicosídica através dos carbonos anoméricos (Figura 8), é chamada de 2-O-(α -D-glicopiranosil)- β -D-frutofuranose, com fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. Devido a esta ligação, a sacarose não é um açúcar redutor. É o carboidrato de baixa massa molecular mais abundante, encontrado em frutas, vegetais e grãos, mas a obtenção comercial ocorre principalmente a partir da beterraba e da cana-de-açúcar. O Brasil vale-se da cana-de-açúcar por conter de 15% a 20% de sacarose. É ainda utilizada como açúcar em alimentos, matéria-prima para as indústrias químicas e também para produzir etanol. (NELSON e COX, 2019; BARREIROS e BARREIROS, 2012; MANHANI, CAMPOS e DONATI, 2014; FERREIRA, ROCHA e FERNANDO, 2009)

Quando consumida, a sacarose é quebrada em glicose e frutose para ser absorvida. A glicose então estimula a liberação de insulina, aumentando a quantidade de frutose que é absorvida.

Figura 8 - Sacarose



Fonte: NELSON e COX, 2019

Os açúcares são principalmente usados em alimentos para melhorar seu sabor, tornando-os doce. Também podem ser utilizados como aditivo alimentar, aromatizante, antioxidante, corante, preservativo, emulsificante, edulcorante, umectante, intensificador de sabor, enzima e nutriente. Por sua versatilidade são adicionados em inúmeros alimentos, tanto doces quanto salgados e costumam estar entre os seus principais ingredientes. (JAPUR *et al.*, 2021)

2.2.2. Excesso no consumo de açúcares

De acordo com a International Sugar Organization, em 2021, o consumo mundial de açúcares aumentou para, aproximadamente, 168 milhões de toneladas, representando um aumento de 0,155 milhão de toneladas com relação ao ano de 2020. Em contraditório, o consumo médio per capita mundial diminuiu para 21,4 kg, uma queda de 0,2 kg em relação ao ano anterior. O Brasil é o quarto país que mais consome esses carboidratos, apresentando consumo médio diário de 18 colheres de chá de açúcar por pessoa, o que corresponde a 80 g de açúcar por dia. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; ISO, 2022)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que o consumo de açúcares livres seja menor de 10% da ingestão total de energia diária para adultos e crianças e sugere que o ideal seria o consumo de no máximo 5%, consideram-se açúcares livres os monossacarídeos e dissacarídeos adicionados a alimentos e bebidas e os açúcares naturais presentes no mel, xaropes e sucos. Desse modo, ao se considerar uma dieta diária de 2000 calorias, 10% desse total (200 calorias), representa a sugestão de 50 g de consumo de açúcar diário. Com base nesses dados,

os brasileiros consomem mais açúcar por dia do que o indicado pela OMS. (WHO, 2015; SAÚDE, 2022)

Uma das principais preocupações com o consumo excessivo de açúcar são quais malefícios e doenças que esse excesso pode causar. A OMS se preocupa que o consumo dos açúcares livres aumente a ingestão total de energia e reduza o consumo de alimentos com calorias nutritivas, o que ocasionará um ganho de peso, podendo levar a obesidade, aumentando assim, o risco de desenvolver doenças crônicas não transmissíveis como diabetes, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e câncer. Outra preocupação associada ao alto consumo de açúcares livres são as cáries dentárias. (WHO, 2015; GAINO e SILVA, 2015)

Estudos mostram que o aumento da incidência de obesidade está relacionado com o aumento no consumo de açúcar, pois a ingestão desses carboidratos geram um perfil endócrino que favorece o aumento da ingestão de energia e ganho de peso. Além disso, a frutose terá um processamento e efeito diferente no corpo do que a glicose. A glicose não é armazenada no fígado, ela passa da corrente sanguínea para os músculos, tecido adiposo e outros tecidos com ajuda da insulina onde é usada imediatamente como energia. Por sua vez, a frutose é convertida pelo fígado em glicose, lactato e/ou ácidos graxos antes de ir para a corrente sanguínea e, então, é oxidada em outros tecidos para obter energia, não necessitando do auxílio da insulina. (FREEMAN *et al.*, 2018; GAINO e SILVA, 2015)

Outra desvantagem da frutose é que ela não é tão eficiente na produção dos hormônios da saciedade e não suprime o hormônio do apetite (grelina). Em outras palavras, a frutose não ativa os hormônios que permitem ao corpo mandar sinais para parar de comer, o que faz com que sejam consumidas mais calorias que o necessário. Além do ganho de peso, o excesso de frutose pode aumentar o acúmulo de gordura no fígado, contribuir para o aumento de triglicérides e colaborar para doenças neurodegenerativas como Alzheimer, além de doenças inflamatórias crônicas como asma e diabete. (FREEMAN *et al.*, 2018)

Além disso, deve-se considerar a capacidade viciante do açúcar, outro aspecto negativo gerado pelo excesso do carboidrato, podendo ser comparado a drogas de abuso. Por ser um alimento saboroso o açúcar aciona os sistemas de recompensa

devido ao seu sabor e a ingestão de calorias, porém, em excesso esses sistemas de recompensa são acionados muito fortemente o que pode induzir a compulsão alimentar. As evidências de dependência ao açúcar puro só foram observadas em pesquisas com roedores realizadas por Freeman *et al.* (2018), que apresentaram compulsão alimentar e abstinência após o acesso seguindo de privação de açúcar. (FREEMAN *et al.*, 2018; AVENA, RADA e HOEBEL, 2008)

Devido às preocupações com a saúde diretamente relacionadas ao consumo excessivo de açúcar, muitas pesquisas são voltadas para descobrir e confirmar a quantidade de açúcares presentes em alimentos utilizando-se de diversas técnicas analíticas. Pode-se citar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia gasosa, a refratometria, a espectrometria de infravermelho e RMN. (NAVARRO *et al.*, 2020)

Ramasami e colaboradores (2004), utilizaram densidade, refratometria e espectroscopia de infravermelho (IV) para quantificar açúcares presentes em refrigerantes e sucos de fruta. Para essas análises foi necessário um preparo de amostra que consistia na retirada do gás dos refrigerantes e centrifugação dos sucos, além da descoloração das bebidas por aquecimento com carvão ativado. Além disso, os espectros obtidos pela espectroscopia de IV precisaram de um tratamento matemático antes da quantificação dos carboidratos.

A quantificação de açúcares realizada pelos métodos de refratometria e densidade possibilitam a determinação da quantidade total de açúcares, já a espectroscopia de IV é capaz de determinar separadamente a quantidade de sacarose, frutose e glicose. Os resultados obtidos pelas técnicas de densidade e refratometria foram um pouco maiores que os obtidos pela espectroscopia de IV. Além disso, os refrigerantes apresentaram maior quantidade de frutose que os sucos com adição de açúcar. Nos sucos sem adição de açúcar não foi observado quantidades significativas de sacarose como visto nos sucos adoçados. (RAMASAMI, *et al.*, 2004)

Outro exemplo foi da determinação da quantidade de açúcar em sucos de frutas feita por Betta e colaboradores, empregando eletroforese capilar. O método foi escolhido por ser simples, rápido e ideal para ser utilizado em laboratórios que fazem muitas análises. Entretanto, a maioria dos teores obtidos discordaram dos

apresentados nos rótulos dos produtos, além disso, cinco das sete amostras obtiveram uma variação maior que os $\pm 20\%$ permitido pela legislação brasileira, mostrando que essas amostras não cumpriam as normas estabelecidas para rotulagem. Mesmo assim, a técnica se mostrou adequada para quantificar açúcares totais em sucos de frutas. (BETTA *et al.*, 2015)

A CLAE é outra técnica muito empregada para quantificação de açúcares em alimentos. Rodrigues e associados aplicaram essa técnica em sucos de maçã, uva, laranja e tangerina para determinar a quantidade de sacarose, frutose, glicose e de alguns ácidos orgânicos. As amostras foram diluídas na fase móvel e filtradas utilizando um filtro e um cartucho para retirar possíveis interferentes e só então analisadas utilizando dois detectores, um de índice de refração para analisar os açúcares e um diodo para os ácidos. Utilizando a CLAE foi possível determinar e quantificar simultaneamente e de maneira eficiente os açúcares: sacarose, glicose e frutose, além de quatro ácidos orgânicos: cítrico, ascórbico, málico e tartárico, comprovado pelos baixos limites de detecção e quantificação obtidos. (RODRIGUES *et al.*, 2021)

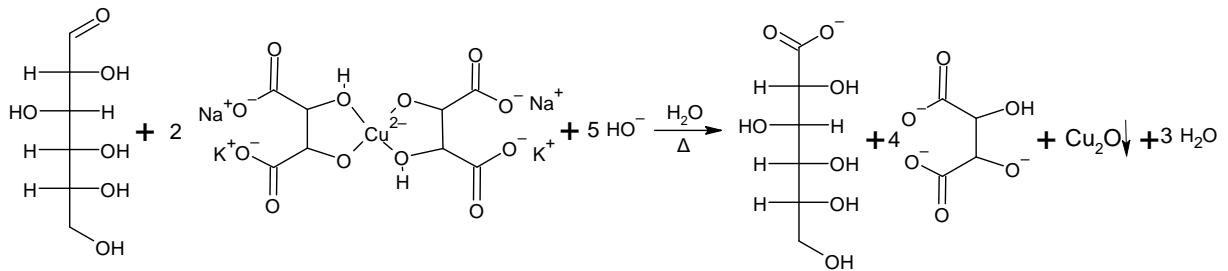
As técnicas de titulação (Lane-Eynon ou Fehling) e espectrofotometria (Somogyi-Nelson, fenol-sulfúrico e ácido 3,5-dinitrossalicílico) também podem ser utilizadas para determinação da quantidade de carboidratos. Esses métodos determinam a concentração de açúcares redutores, aqueles que tem um grupo carbonílico aldeído livre, por exemplo, a frutose e glicose, mas também é possível determinar os carboidratos não redutores, como a sacarose. Para isso, entretanto, é necessário hidrolisar os carboidratos não redutores para que se tornem açúcares redutores. (TAVARES *et al.*, 2010)

Os métodos de Fehling e de Somogyi-Nelson são baseados na redução de íons de cobre em soluções alcalinas. No método de Somogyi-Nelson os açúcares redutores reduzem o Cu^{2+} a Cu^+ formando óxido de cobre (Cu_2O) que reduz o arsênio-molibdico ao óxido molibdênio. O óxido de molibdênio apresenta coloração azul e, assim, é possível determinar a quantidade de açúcar pela absorvância desse composto colorido. (TAVARES *et al.*, 2010; SILVA, MONTEIRO, ASQUIERI, 1999)

O método de Lane-Eynon ou Fehling utiliza o reagente de Fehling que consiste

em uma solução de sulfato de cobre (II), tartarato de sódio e potássio em meio alcalino, que apresenta cor azul profunda. Na presença de açúcares redutores os sais de Cu^{2+} são reduzidos, formando Cu_2O que é um sólido vermelho. Essa reação é mostrada na Figura 9. A presença do precipitado vermelho significa que o resultado é positivo, indicando que existem açúcares redutores. (TAVARES *et al.*, 2010)

Figura 9 - Reação do método de Fehling



Fonte: adaptada de TAVARES *et al.*, 2010

Para a quantificação dos açúcares redutores através do método de Fehling é realizada uma titulação, onde alguns cuidados devem ser tomados para garantir exatidão nos resultados, como ebulição constante da solução para não ocorrer a oxidação do Cu_2O pelo ar e titulação deve ser feita rapidamente, máximo de 3min, para não ocorrer decomposição dos açúcares com o aquecimento. Além disso, como a relação entre o cobre reduzido e o açúcar redutor não é estequiométrica se faz necessário uma padronização da solução de Fehling com uma solução de glicose de concentração conhecida. (TAVARES *et al.*, 2010)

As principais desvantagens dos métodos de Somogyi-Nelson e Fehling são que os resultados são dependentes do tempo de reação, temperatura e concentração dos reagentes, os métodos não apontam quais açúcares estão presentes e outras moléculas redutoras podem interferir no processo. Além disso, como o método de Fehling é titulométrico, a acurácia do método depende da experiência do analista em determinar quando a reação muda de cor para terminar a titulação. (TAVARES *et al.*, 2010; SILVA, MONTEIRO, ASQUIERI, 1999)

A titulação, em específico a de Lane-Eynon ou de Fehling é considerada o método padrão oficial para análise físico-química de bebidas não alcoólicas para determinação de açúcares totais pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2005). Apesar disso, a refratometria é uma técnica

muito usada no controle industrial para determinar a quantidade de açúcar nas bebidas, por ser prática e simples de usar, além de não necessitar de preparo de amostra e entregar o resultado exigido pelas normas brasileiras para a rotulagem das bebidas, a quantidade de açúcar total. (CALDAS *et al.*, 2015)

Na refratometria o aparelho utilizado é o refratômetro, que se baseia na mudança da direção do feixe de luz quando atravessa dois meios diferentes, por exemplo, o ar e o suco. Esse desvio é o ângulo de refração, medido em graus. Porém, o aparelho fornece o resultado como índice de refração, conforme a equação (1). (CALDAS *et al.*, 2015)

$$n = \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} \quad (1)$$

Onde n é o índice de refração do meio 2 em relação ao 1; e θ_1 é o ângulo de incidência e θ_2 o ângulo de refração da luz.

Como a refratometria se baseia no índice de refração da luz no líquido analisado, todas as substâncias presentes nele afetam a medida. Estão, no resultado será contabilizado os açúcares, ácidos das frutas, sais minerais, proteínas entre outros, ou seja, todos os sólidos solúveis presentes. (USDA, 2020)

Como a refratometria mede o índice de refração de um líquido, todos os sólidos presentes nele, tanto os solúveis quanto os não solúveis, influenciam nessa medição. Para utilização da técnica de refratometria para determinar a quantidade de açúcar, considera-se que o principal sólido presente na bebida que afetará o índice de refração é o açúcar, pois ele tende a estar em maior concentração comparado as demais substâncias presentes. Porém, como também podem existir sais, proteínas, ácidos e outros sólidos na amostra, o valor obtido pode ser maior do que a concentração real de açúcar. Desse modo é possível concluir que a técnica de refratometria não é uma técnica específica apenas para as moléculas de açúcar, visto que outras substâncias também são contabilizadas ao mesmo tempo. Além disso, a técnica não possibilita a identificação de quais carboidratos estão presentes e quais são suas quantidades individuais, devido ao resultado obtido ser apenas a quantidade de açúcares totais.

O índice de refração também é influenciado pela temperatura, pressão,

comprimento de onda e fonte de radiação da luz e pelas características da substância analisada. Como a temperatura uma das propriedades que mais influência no resultado obtido, é necessário corrigir esse fator quando a análise é feita em temperatura diferente de 20 °C. Dessa forma, é possível comparar os resultados obtidos com dados que são tabelados. (USDA, 2020)

A técnica de RMN tem sido utilizada na análise de alimentos para determinar a presença e a quantidade de substâncias presentes em bebidas e comidas. O funcionamento e utilização dessa técnica serão apresentados na próxima seção.

A partir desses exemplos e dos outros apresentados na seção anterior, foram observadas técnicas analíticas diferentes que podem ser aplicadas para determinar a quantidade de açúcar presente em alimentos, cada uma delas apresentando suas vantagens e desvantagens, sendo utilizadas a depender do alimento, da precisão e da exatidão que deseja ser alcançada.

2.3. Ressonância Magnética Nuclear

A RMN é uma técnica espectroscópica utilizada para determinar estruturas de moléculas orgânicas. Recentemente, estudos mostram que a técnica de RMN também pode ser empregada para análises quantitativas, atendendo a diversas áreas do conhecimento, como exemplos: na biologia, para estudar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, aminoácidos e carboidratos; na química que a emprega para monitorar reações, identificar estruturas e avaliar a pureza; na área farmacêutica, para determinar a pureza e quantificar princípios ativos nos produtos e; no setor petrolífero, a fim de avaliar hidrocarbonetos e seus produtos. Também, é muito utilizada na caracterização de amostras de alimentos para realizar controle de qualidade e encontrar fraudes alimentares em sucos de frutas, azeite, vinho e especiarias. (MERCK; NAVARRO, *et al.*, 2020)

Os sinais de RMN existem devido ao fenômeno mecânico quântico de *spin* nuclear dos átomos, propriedade fundamental de partículas com carga e movimento e que apresentam um momento angular. O *spin* pode ser descrito pelo número quântico de spin (I), assumindo valores 0 ou múltiplos de 1/2. Os átomos que

apresentam sinal de RMN são aqueles com *spin* nuclear diferente de zero, porém os mais utilizados são os com $I = 1/2$, como ^1H e ^{13}C . (SILVERSTEIN *et al.*, 2019; BENEDITO, 2018; PAVIA *et al.*, 2016)

O movimento da carga também gera momento magnético (μ), determinado por:

$$\mu = \gamma P \quad (2)$$

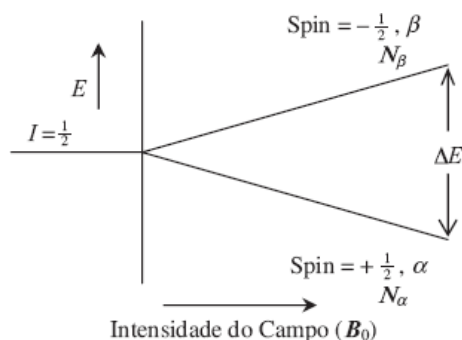
Onde P é o momento angular e γ é a constante magnetogírica, única para cada núcleo e determinada experimentalmente.

Quando é aplicado um campo magnético externo, ocorre o alinhamento dos momentos magnéticos com o campo, em um número discreto de orientações, determinado por:

$$2I + 1 \quad (3)$$

No caso do ^1H , ele terá duas orientações: a favor do campo ($1/2$ ou α), o estado de menor energia ou contrário ao campo ($-1/2$ ou β), o estado de maior energia (Figura 10). Os momentos magnéticos se distribuem nesses dois estados, conforme a distribuição de Boltzmann e existe um pequeno excesso de população no estado de mais baixa energia. (SILVERSTEIN *et al.*, 2019; BENEDITO, 2018; PAVIA *et al.*, 2016)

Figura 10 - Representação dos níveis de energia dos núcleos de hidrogênio

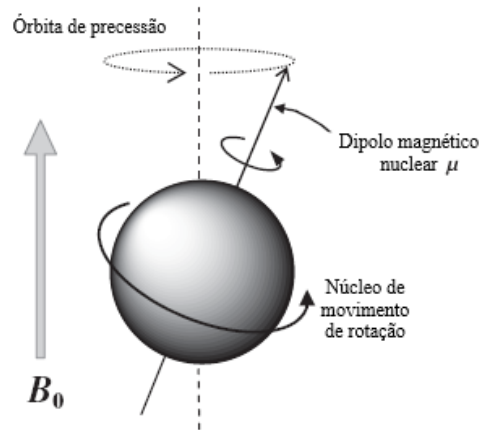


Fonte: SILVERSTEIN *et al.*, 2019

O campo magnético gera um torque sobre o momento magnético causado pela disputa entre o momento angular que tende a manter o núcleo em movimento de *spin* e o campo magnético que alinha o momento angular com seu campo, isso resulta no movimento de precessão em torno do eixo z (Figura 11). A frequência da precessão

é igual à frequência de Larmor. (SILVERSTEIN *et al.*, 2019)

Figura 11 - Representação de um núcleo em precessão



Fonte: SILVERSTEIN *et al.*, 2019

Durante a precessão os momentos magnéticos também se movimentam, então é possível representá-los como vetores e, ao somar todos, os vetores que estão no eixo x e y se cancelam restando apenas os que estão apontando para o eixo z , correspondente ao excesso de população do estado α , formando assim, o vetor de magnetização resultante, que irá apontar para o positivo do eixo z . Esse vetor magnético resultante pode assumir qualquer valor e orientação, pois representa a somatória da população.

Quando se aplica um pulso de radiofrequência, é exercido um torque no vetor magnético resultante, fazendo com que ele modifique sua direção se aproximando do plano xy . Em outras palavras, os núcleos absorvem uma determinada quantidade de energia (ΔE), sendo excitados do estado de spin de menor energia para o de maior energia (SILVERSTEIN *et al.*, 2019; BENEDITO, 2018), descrito pela equação (4):

$$\Delta E = \frac{h\gamma}{2\pi} B_0 \quad (4)$$

Onde, B_0 é o campo magnético aplicado, h é a constante de Planck e γ é a constante magnetogírica. A energia da radiação deve ser igual a energia de precessão, ou seja, igual a diferença de energia entre os estados α e β , para ser possível excitar os estados de *spin*.

Após a excitação dos núcleos, a magnetização resultante se desloca do eixo z

e, assim, os *spins* entram em coerência de fase, o que significa ser direcionados para um dos lados do plano *xy*. Então, a nova somatória resultante será um vetor na direção do eixo *x* ou *y*. A aproximação do vetor magnético resultante do plano *xy* é controlada pelo grau do pulso aplicado. Após desligar o pulso de radiofrequência, a magnetização resultante retorna precessando ao seu estado de equilíbrio no eixo *z*. Para isso ocorrer é necessário que a energia recebida seja liberada através dos processos de relaxação. (SILVERSTEIN *et al.*, 2019)

Existem dois tipos de relaxação, a relaxação de *spin* longitudinal, quantificada pela constante de tempo T_1 e a transversal, quantificada por T_2 . A relaxação T_1 é um relaxamento entálpico, faz com que os vetores de magnetização de *spin* voltem para o eixo *z* e ocorre pela transmissão de energia para a vizinhança na forma de aquecimento, devido a isso ela não é imediata e depende de cada núcleo e seus vizinhos. A relaxação T_2 é a perda da magnetização ao longo do plano *xy*, ou seja, pela perda da coerência de fase adquirida com o pulso de radiofrequência. Ocorre pela troca de energia entre os *spins*, e, sendo assim, é um processo entrópico. (SILVERSTEIN *et al.*, 2019; PAVIA *et al.*, 2016)

2.3.1. RMN quantitativo

A RMN também pode ser usada como técnica quantitativa, RMNq, que relaciona o sinal com a concentração do analito. Trata-se de uma técnica não destrutiva, que não precisa separar o analito da mistura antes da análise e não necessita de material de referência que tenha o analito, visto que a resposta irá depender da quantidade de núcleos que contribuem para uma linha de ressonância.

A técnica se baseia no princípio de que a área de um sinal (I_x) do espectro é diretamente proporcional ao número de hidrogênios (N_x) que geram esse sinal e a uma constante do espectrômetro, k_s . (SANTOS e COLNAGO, 2013)

$$I_x = k_s N_x \quad (5)$$

Assim, para quantificar uma substância por meio de um espectro RMN é possível utilizar a relação molar de dois sinais (n_x/n_y), por uma determinação relativa:

$$\frac{n_x}{n_y} = \frac{I_x N_y}{I_y N_x} \quad (6)$$

Outro princípio importante para obter espectros quantitativos e garantir que o sinal seja proporcional ao número de hidrogênios é o fato de ser necessário esperar que todos os átomos tenham relaxado completamente, isso significa esperar um tempo cinco vezes maior que o tempo de relaxação longitudinal ($5T_1$). Normalmente, o tempo de relaxação longitudinal do hidrogênio é de 0,5 s a 5 s, mas esse valor depende do núcleo e dos seus vizinhos.

Para realizar a quantificação do espectro, escolhe-se um sinal de hidrogênio que deve estar isolado, sem sobreposição, ter a menor multiplicidade possível, de preferência um simpleto, e deve-se conhecer o número de hidrogênios desse sinal. Com essas precauções reduzem-se os erros da medida e garante que será quantificado apenas uma molécula. Seguindo esses critérios, a incerteza na medida é baixa e tem desempenho semelhante as outras técnicas analíticas. (RUNDLÖF *et al.*, 2010)

Os métodos mais utilizados para a quantificação dos sinais do espectro de RMN são: padrão interno, padrão externo e ERETIC (calibração por pulso elétrico). Eles apresentam vantagens e desvantagens e serão mais indicados dependendo da molécula analisada e do objetivo da análise.

O método de padrão interno consiste em adicionar uma substância diferente da analisada nas amostras, que funcionará como um padrão e então usar o sinal dessa substância para quantificar o sinal da amostra. Esse método torna a análise mais precisa e exata, pois é necessário realizar apenas uma análise e o padrão está na mesma condição que a amostra, mas é preciso escolher uma substância adequada, que não apresenta sinais nos mesmos deslocamentos que a amostra. No método por padrão externo analisa-se separadamente a amostra e o padrão externo, substância diferente da molécula de interesse, e depois utilizam-se os sinais do padrão externo para a quantificação. Uma das vantagens é que o padrão externo não precisa ter seus sinais em deslocamentos diferentes da amostra, porém, é adicionado mais incertezas no experimento por serem feitas duas análises diferentes. (SERRANO, 2019)

O método por pulso elétrico, ERETIC, trata-se de uma quantificação com

calibração eletrônica, que usa um sinal gerado eletronicamente, parecidos com o sinal real obtido, como referência, dispensando o uso de uma substância como padrão interno ou externo e esse sinal pode ser deslocado para uma região sem sobreposição. Esse método irá utilizar as intensidades absolutas e comparadas para calcular as áreas dos sinais nos espectros. (BENEDITO, 2018; GUIMARAES, 2019; WANG *et al.*, 2021)

Por ser uma técnica capaz de determinar o analito de interesse em misturas, a RMNq é muito utilizada na área alimentar para controle de qualidade e detecção de fraude e adulteração, na indústria farmacêutica para quantificar princípios ativos em remédios, para determinar e estudar os produtos naturais, metabólicos biológicos e drogas, entre outros. (WANG *et al.*, 2021; NAVARRO *et al.*, 2020; BENEDITO, 2018; GUIMARAES, 2019; SANTOS, 2013)

Em 2020, Navarro e colaboradores mostraram em seu trabalho a análise e quantificação de açúcares (sacarose, glicose e frutose) presentes em sucos frescos e industrializados de laranja e uva utilizando a técnica de RMNq, com o método ERETIC, o que evitou o uso de compostos diferentes da amostra. Para a análise quantitativa dos sucos, foi necessário realizar a supressão do solvente, a água, para não modificar a linha de base do espectro ou causar problemas de digitalização. A comparação dos espectros dos padrões dos açúcares com os espectros obtidos dos sucos permitiu identificar a presença ou ausência desses carboidratos. (NAVARRO *et al.*, 2020)

No suco fresco de laranja foram identificados os três açúcares (sacarose, glicose e frutose), porém o suco fresco de uva apresentou apenas glicose e frutose. Quando comparado os sucos fresco e o industrializado, verificou-se que apresentaram os mesmos açúcares, mas em proporções diferentes. (NAVARRO *et al.*, 2020)

Para determinar a proporção relativa dos três açúcares, utilizou-se a integral dos sinais de RMN de ^1H do: H1 da sacarose, em 5,39 ppm; do H1 da glicose atribuído aos dupletos em 5,21 ppm e 4,63 ppm da α -glicose e β -glicose, respectivamente; e o sinal em 4,00 ppm atribuído aos H3 e H4 da β -frutose, uma vez que esses sinais tinham a sobreposição diminuída. No caso da glicose, foi preciso usar dois sinais de ^1H para quantificá-la, por existir nas formas α e β . (NAVARRO *et al.*, 2020)

Entre 4,00 e 4,50 ppm foram identificados sinais da frutose e da sacarose. Considerando que a sacarose é formada por uma molécula de frutose e uma de glicose, os sinais nessa região podem ser da unidade de frutose que forma a sacarose ou da frutose em si. Também foi observado que o deslocamento químico dos hidrogênios da frutose que compõe a sacarose apresentou variação dos hidrogênios da frutose pura. Em 4,20 ppm detectou-se o H3 e em 4,04 ppm o H4 da frutose que compõe a sacarose. Já a frutose foi identificada pelo sinal em 4,00 ppm que corresponde aos H3 e H4 da forma β -furanose e em 4,10 ppm o sinal do H5 da forma β -piranose. (NAVARRO *et al.*, 2020)

Nessa trabalho Navarro e colaboradores identificaram que os valores de concentração dos açúcares concordavam com as informações dispostas nas rotulagens. (NAVARRO *et al.*, 2020)

A técnica de RMN possibilita a identificação e quantificação de uma ou mais substâncias em uma amostra sem a necessidade da separação dos analitos da mistura antes da análise, além de não ser necessários extensivos ou demorados preparos de amostra. Outra vantagem é não precisar utilizar um padrão contendo a molécula que está sendo analisada, como explicado anteriormente nos métodos de padrões utilizados para quantificação. Por esses motivos, a técnica de RMN foi escolhida para analisar os sucos de fruta visando a identificação da presença e determinação da quantidade dos açúcares: sacarose, frutose, α - e β -glicose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar e quantificar os açúcares: frutose, glicose e sacarose, em sucos e bebidas adoçadas industrializadas de uva e maçã, utilizando RMN de ^1H .

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração de frutose, glicose e sacarose em sucos industrializados de uva e maçã utilizando RMNq de ^1H .
- Determinar a concentração de frutose, glicose e sacarose em bebidas adoçadas industrializadas de uva e maçã utilizando RMNq de ^1H .
- Determinar a quantidade de açúcares totais nos sucos e bebidas adoçadas de maçã e uva utilizando a técnica de refratometria.
- Comparar as quantidades de açúcares totais obtidas através das técnicas de RMNq de ^1H e refratometria com os valores dos rótulos das bebidas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

Foram analisadas um total de nove amostras, das quais cinco eram do sabor de maçã e quatro do sabor de uva. Dentre as amostras analisadas, foram selecionadas bebidas de fruta adoçada, sucos compostos 100% de fruta e integral. As amostras analisadas foram obtidas em comércios da cidade de Brasília e suas características estão apresentadas na Tabela 1. Para facilitar sua identificação, as amostras foram numerada e acrescidas com uma letra minúscula referente ao sabor da bebida, ou seja, “m” para as bebidas de maçã e “u” para as de uva.

Tabela 1 - Amostras de sucos analisadas

Amostra	Sabor	Marca	Tipo	Volume (mL)	Lote	Validade
1m	Maçã	Natural One	100%	300	D2061	31/08/23
2m	Maçã	Organobio	Integral	1000	L1221	03/24
3m	Maçã	Yakult	100%	200	1523	04/10/23
4m	Maçã	Natural One	100%	900	S5046	25/10/23
5m	Maçã	Del Valle Kapo	Bebida de fruta adoçada	200	RP4	19/12/23
1u	Uva	Aliança	Integral	1000	13151701	25/02/24
2u	Uva	Tial	100%	1000	0109A23	09/01/24
3u	Uva	Plenno	Integral	1500	CS3286	03/02/24
4u	Uva	Del Valle Kapo	Bebida de fruta adoçada	200	RP2	02/01/24

Fonte: a autora

Todas as amostras foram adquiridas e analisadas dentro de suas datas de validade, pois nesse período o fabricante garante que se as recomendações de armazenamento forem seguidas, a qualidade aquele alimento é mantida e o produto pode ser consumido com segurança.

A amostra 1m, suco de maçã feito de 100% da fruta, foi utilizada como uma amostra teste para determinação da melhor sequência de pulso para a supressão da água e realização dos espectros para a atribuição dos sinais.

As amostra 5m e 4u não são consideradas sucos, mas bebidas adoçadas, pois são diluídas com água, contendo 10% e 10,6% de suco da fruta, respectivamente, além de ser acrescidas de açúcares e aditivos, tais como vitaminas, corantes, conservantes, aromas, entre outros.

As bebidas de uva apresentaram coloração roxa, sendo os sucos integrais de

uma cor mais escura e profunda. Já as bebidas de maçã apresentaram uma cor amarelada. As bebidas adoçadas, foram as amostras mais diferentes na questão da cor, a bebida adoçada de uva exibiu cor roxa muito clara, quase rosa clara, e a bebida adoçada de maçã uma coloração amarelada extremamente pálida, além disso, essas bebidas eram translúcidas, não apresentando nenhum sólido.

Os rótulos das amostras exibiam os ingredientes que constituíam as bebidas, conforme apresentado na Tabela 2. Devido à legislação brasileira proibir apenas a adição de corante e aroma artificial aos sucos e não apresentar regulação sobre antioxidantes e conservantes, foi observada a presença desses compostos em alguns sucos integrais e em sucos 100% de fruta a exemplo das amostras 3m, 4m, 1u, 2u, 3u. (BRASIL, 2009)

Tabela 2 - Ingredientes nas amostras

Amostra	Ingredientes
1m	Suco de maçã reconstituído e suco de maçã verde reconstituído
2m	Maçã orgânica
3m	Suco de maçã concentrado, água, acidulante ácido cítrico e aroma natural de maçã
4m	Suco de maçã integral e antioxidante ácido ascórbico
5m	Água, açúcar, suco concentrado de maçã, suco concentrado de limão clarificado, vitaminas (C, E, B3, A, D, B6 e B12), aromatizante, estabilizante goma guar, acidulante ácido cítrico e corantes naturais caroteno e antocianina
1u	Uvas e antioxidante INS220
2u	Suco de uva reconstituído (100%), acidulante ácido cítrico, aroma natural de uva e vitamina C
3u	Uva "in natura", antioxidante INS 220 e conservante 202
4u	Água, açúcar, sucos concentrados de uva e maçã, vitaminas (C, E, B3, A, D, B6 e B12), aromatizante, acidulante ácido cítrico, corante natural antocianina e estabilizante goma guar

Fonte: a autora

4.2. Preparo de amostra

Em microtubos do tipo Eppendorf, foram adicionados 500 µL da bebida e 50 µL

de água deuterada (D_2O) 99,9% contendo 0,55 g/L de ácido trimetilsililpropanóico (TSP), coletados com micropipetas de 1000 μL e 100 μL , respectivamente. Todos os volumes pipetados foram conferidos utilizando uma balança com quatro casas decimais, para garantir que o volume coletado fosse o desejado. Então, todo o volume foi transferido para tubos de RMN de 5 mm para serem analisados.

4.3. Preparo da referência externa

Os padrões de referência externa foram preparados utilizando dimetilsulfona (DMS) 100%, 500 μL de água e 50 μL de água deuterada (D_2O) 99,9% contendo 0,55 g/L de ácido trimetilsililpropanóico (TSP).

Foram feitos dois padrões de referência externa. No primeiro foi utilizado 0,0226 g de DMS e concentração final obtida foi de 0,4393 mol.L⁻¹ e no segundo padrão usou-se 0,0132 g, obtendo a concentração final de 0,2606 mol.L⁻¹.

4.4. Teste de estabilidade das amostras

Foram realizados testes de estabilidade em todas as amostras, com exceção da amostra 1m. As amostras foram homogeneizadas manualmente e então armazenadas em frascos diferentes das garrafas originais das bebidas por um período de seis dias à temperatura ambiente e com exposição a luz. Apenas a amostra 2m foi armazenada em um frasco do tipo Eppendorf de 5 mL. As demais amostras foram guardadas nos frascos de RMN já preparadas com água deuterada. Após esse período, as amostras foram analisadas.

4.5. Análise por RMN

Foram adquiridos os experimentos de quantificação das amostras dos sucos de maçã e uva industrializados utilizando o espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III HD 600 MHz equipado com sonda do tipo Broadband Observe 5 mm, situado no laboratório da Central Analítica do Instituto de Química (CAIQ) da Universidade de Brasília (UnB).

Além dos procedimentos usuais de *lock* e *shimming*, antes de cada aquisição, a sonda foi sintonizada manualmente e o pulso de 90° (P90) calibrado

automaticamente (comando pulsecal). Para evitar a presença de artefatos do tipo *side band* e diminuir a possibilidade de sobreposição de sinais, os espectros foram obtidos sem o giro da amostra. Os parâmetros utilizados na aquisição dos espectros foram escolhidos de modo a garantir a obtenção de um espectro quantitativo e uma relação sinal-ruído acima de 10 para os sinais utilizados na quantificação.

Foi realizada a supressão do sinal da água (em 4,81 ppm) em todos os espectros de RMNq de ^1H das amostras. Para isso um primeiro espectro de RMN de ^1H foi adquirido utilizando a sequência de pulso zg30, sequência sem supressão do sinal da água, para marcação da frequência da água que foi suprimida no próximo espectro adquirido. No primeiro espectro de RMN de ^1H foi utilizado um tempo de espera entre cada aquisição de 1s, temperatura de 298 K e 16 varreduras.

Após a aquisição do espectro de RMN de ^1H sem supressão do sinal da água, foi adquirido outro espectro com a sequência de pulso noesygppr1d, sequência de pulso escolhida para realização da supressão do sinal da água. Esses espectros foram obtidos com 16 varreduras, tempo de espera entre cada aquisição de 15s, ganho do receptor de 8 e temperatura de 298 K. O tempo médio para a aquisição dos espectros de RMN de ^1H com supressão do sinal da água foi de 5 min.

Também foi realizado um espectro de RMN de ^{13}C da amostra 1m, utilizando a sequência de pulso zgpg30. E espectros bidimensionais ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC dessa mesma amostra, utilizando 32 varreduras, ganho do receptor a 203, 1s de tempo de espera entre cada aquisição e as sequências de pulso hsqcedetgpcp.3 e hmbcetgpcp2nd, respectivamente.

Os espectros foram processados com o software TopSpin. Uma função exponencial do tipo *line broadening* poderá ser aplicada previamente à transformada de Fourier. Os parâmetros de fase de ordem zero (comando apk0) e a linha de base com função polinomial de quinta ordem foram aplicados automaticamente. Ajustes manuais de fase e linha de base foram realizados quando necessário e os espectros foram referenciados em relação ao sinal do ácido trimetilsililpropanóico (TSP, 0 ppm). Os intervalos de integração foram definidos manualmente.

4.6. Quantificação dos sinais dos espectros

Para a quantificação, foi selecionado um sinal de cada molécula analisada, que foi

integrado e sua área obtida. Os sinais escolhidos foram aqueles que não tinham sobreposição com sinais de outras moléculas e que não foram suprimidos pela sequência de pulso utilizada para supressão do sinal da água.

Os sinais escolhidos foram: 5,39 ppm para a molécula de sacarose; 5,22 ppm para a α -glicose; 4,10 ppm para a frutose; 3,34 ppm para a β -glicose; e 1,17 ppm para o etanol.

4.7. Refratometria

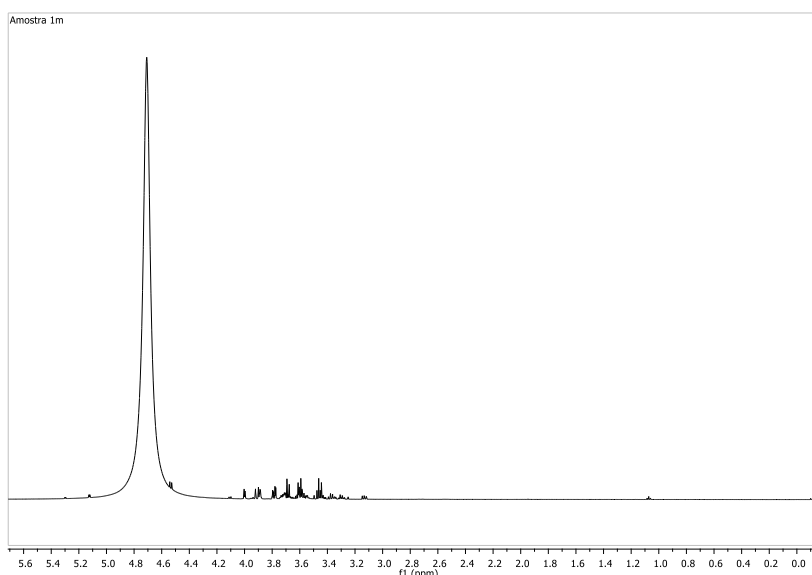
Foram realizadas leituras do índice de refração de todas as amostras, exceto as amostras 1m e 2m. Foi utilizado o refratômetro Abbe-3L da marca Bausch & Lomb localizado no Laboratório de Ensino de Físico-Química do Instituto de Química na Universidade de Brasília.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Supressão do sinal da água

Para realizar as análises de RMN, deve-se levar em consideração que, mesmo os sucos preparados por 100% da fruta, são compostos principalmente por água. Isso gera um problema na obtenção dos espectros de RMN de ^1H , uma vez que o sinal do H da água será o sinal mais intenso no espectro e os outros sinais de interesse da amostra se tornam muito pequenos, quase imperceptíveis, como mostrado na Figura 12. Para contornar esse problema foi necessário reduzir o sinal da água através de um processo de supressão. (SANTANA, 2017; NAVARRO *et al.*, 2020)

Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da amostra 1m sem supressão do sinal da água em 10% D_2O



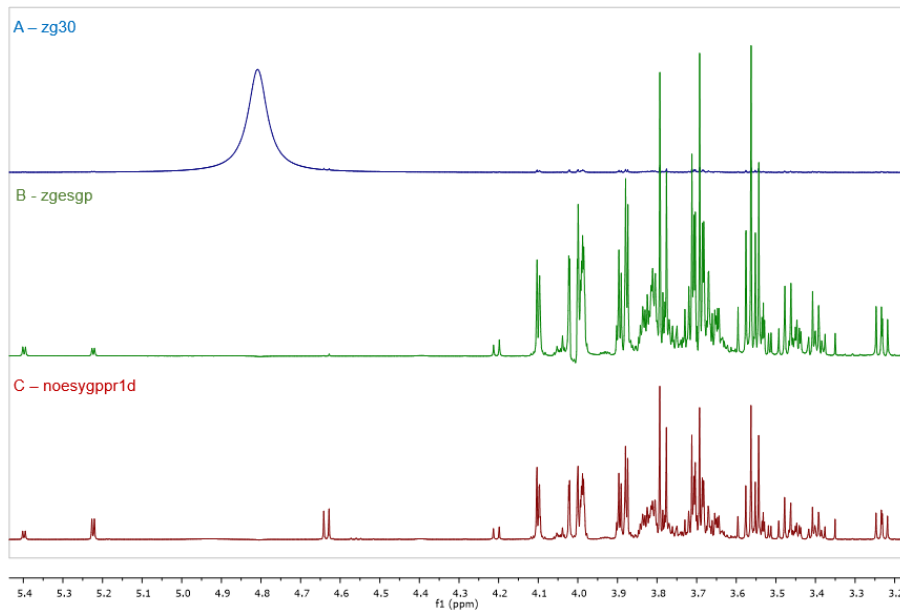
Fonte: a autora

Existem várias sequências de pulsos para realizar a supressão do sinal da água, sendo necessário escolher a sequência correta de acordo com a amostra analisada para que os sinais vizinhos à frequência do sinal da água não sejam também suprimidos. (SANTANA, 2017)

Foram testadas duas sequências de pulso para a supressão do sinal da água (zgesgp e noesygppr1d) em uma amostra de suco. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13. Na Figura 13-A observa-se que o espectro em que nenhuma supressão é realizada, o sinal da água, em 4,81 ppm, é o sinal mais intenso e o único possível de ser observado de forma clara. O espectro apresentado na Figura

13-B utilizou a sequência de pulso chamada zgesgp e o espectro na Figura 13-C foi obtido com a sequência noesygp1d. As sequências avaliadas são capazes de suprimir o sinal da água e permitem a visualização dos outros sinais da amostra.

Figura 13 - Comparação entre os espectros de RMN de ^1H (600 MHz) das sequências de supressão do sinal da água em 10% D_2O



Fonte: a autora

A sequência escolhida para desenvolver esse trabalho foi a sequência noesygp1d (Figura 13-C), pois apresentou melhor resolução dos sinais, melhor linha de base e apresentou menor supressão dos sinais próximos ao da água. Além disso, essa mesma sequência de pulso foi utilizada por Santana (2017) e Navarro e colaboradores (2020) para a análise de sucos, o que corrobora que ela possa ser a sequência de pulso mais adequada para analisar esse tipo de amostra.

Mesmo utilizando a sequência de pulso noesygp1d, foi observado uma supressão no sinal 4,63 ppm referente ao hidrogênio anomérico, da β -glicose. Por esse motivo, esse sinal não pode ser utilizado para quantificação desse carboidrato, pois apresentaria no resultado um valor menor do que o real. Por sua vez, o sinal em 3,23 ppm referente ao H2 dessa mesma molécula, está longe do sinal da água e não sofre influência da sequência de pulso. Esse sinal foi então utilizado para a quantificação da β -glicose. (NAVARRO *et al.*, 2020).

5.2. Atribuição dos sinais de RMN

Os açúcares são os principais compostos nos sucos da fruta, principalmente a glicose, frutose e sacarose. Esses três carboidratos possuem semelhanças estruturais, mas é possível diferenciar os seus sinais nos espectros de RMN de ^1H .

Para a identificação e atribuição dos sinais referente a sacarose, foi obtido o espectro de RMN de ^1H do padrão de sacarose da Bruker que é certificado e selado num tubo contendo 2,0 mmol/L de sacarose, 0,5 mmol/L de DSS, NaN_3 2,0 mmol/L, D_2O a 10% e 90% de H_2O (Anexo A). Para a identificação e atribuição dos sinais dos outros açúcares, além dos espectros monodimensionais de ^1H (Figura 14) e de ^{13}C , foram obtidos os espectros bidimensionais ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC da amostra 1m (Anexo B).

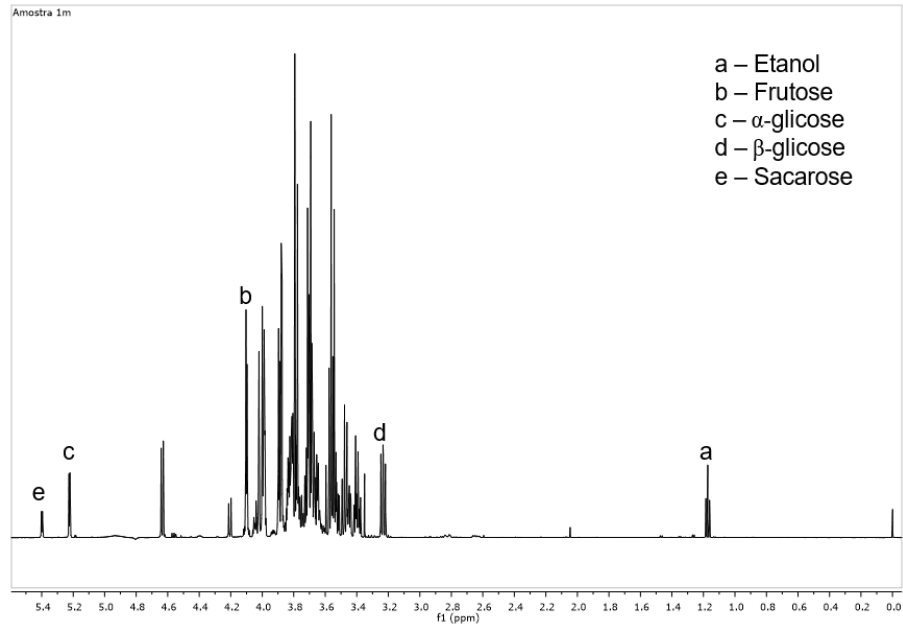
Por meio da análise dos espectros obtidos e pela comparação com dados da literatura (NAVARRO *et al.*, 2020; SANTANA, 2017; DEBIASI, 2020), foi possível identificar e atribuir os sinais dos açúcares frutose, α -glicose, β -glicose, sacarose e do etanol. As tabelas com a atribuição dos sinais estão apresentadas no Anexo C. Os sinais que foram utilizados para quantificação dos compostos estão apresentados na Tabela 3 e estão identificados no espectro de RMN de ^1H da amostra 1m apresentado na Figura 14.

Tabela 3 - Atribuições dos sinais de RMN usados para quantificação

Composto	δ ^1H (ppm)	Número de H do sinal	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
Etanol	1,17	3	t	7,08	19,7
Frutose	4,1	2	m	-	78,4 e 77,4
α-glicose	5,22	1	d	3,83	95,0
β-glicose	3,23	1	dd	9,57 e 7,98	77,1
Sacarose	5,39	1	d	3,84	95,0

Fonte: a autora

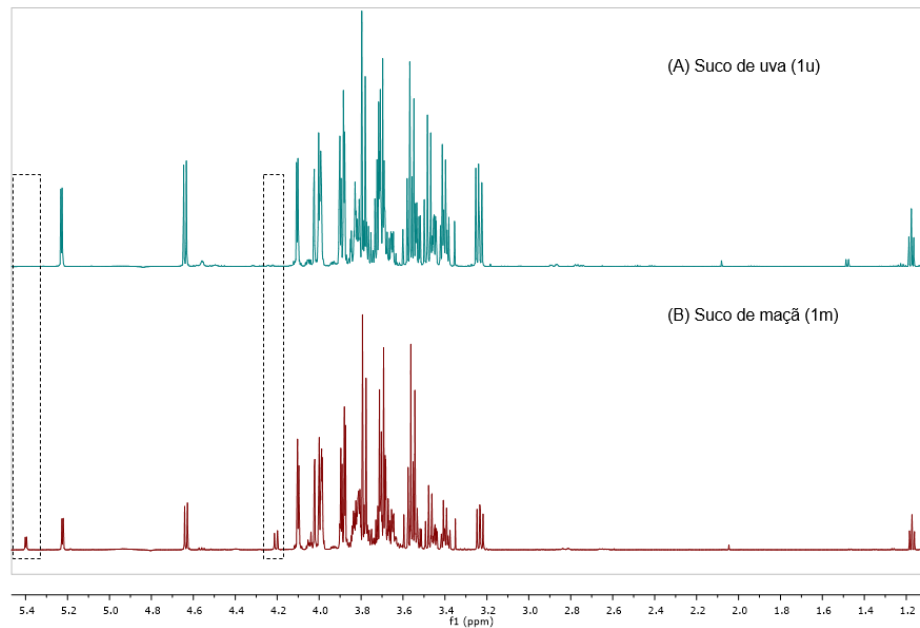
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da amostra 1m em 10% D_2O . Os sinais utilizados nas análises quantitativas estão indicados com letras



Fonte: a autora

Uma avaliação qualitativa da composição de uma amostra de suco de maçã e de uma amostra de um suco de uva pode ser feita por meio da comparação dos espectros de RMN de ^1H (Figura 15). Pode-se ser destacado que a principal diferença entre os espectros foram os sinais de sacarose, em 5,39 ppm e 4,20 ppm, que não foram observados nos sucos 100% de uva (amostras 1u, 2u e 3u). A sacarose é produzida nas folhas da videira e então transportada para os frutos onde é convertida pela enzima invertase em glicose e frutose. Por esse motivo, seu teor é extremamente baixo no fruto. (SANTANA, 2017).

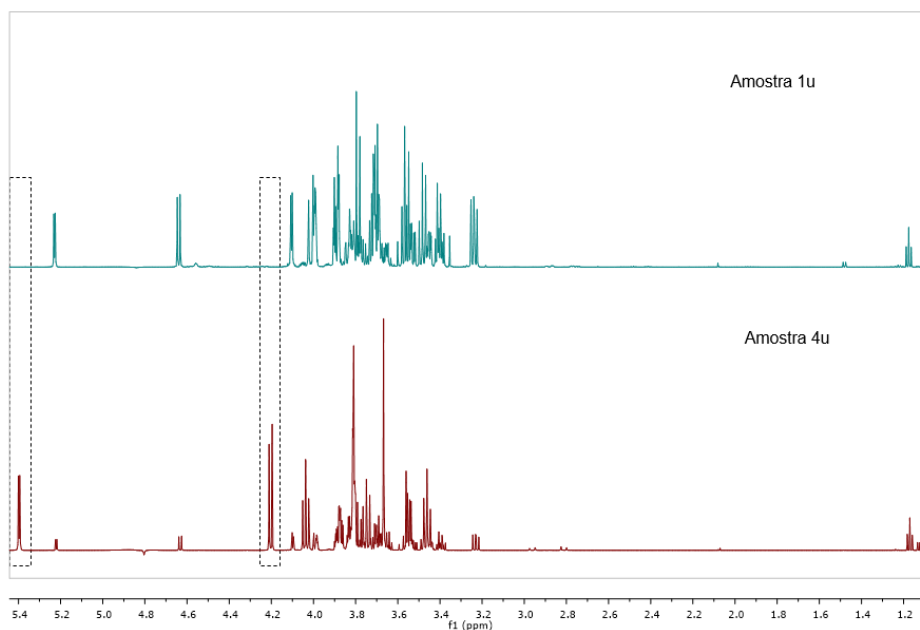
Figura 15 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) dos sucos de (A) maçã e (B) uva em 10% D_2O



Fonte: a autora

Embora nos sucos 100% de uva analisados nesse trabalho não tenha sido detectado o sinal referente a sacarose, quando foi realizada a análise de bebida de fruta adoçada do sabor uva (amostra 4u), detectaram-se os sinais de alta intensidade da sacarose em 5,39 ppm e 4,20 ppm (Figura 16). Isso ocorre pelo fato da bebida ter adição do açúcar sacarose.

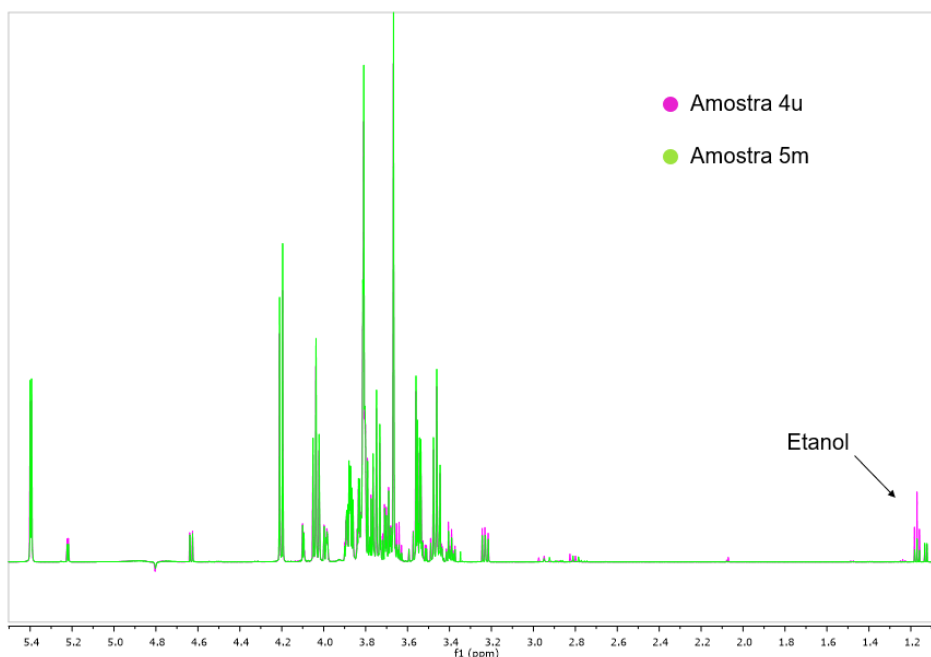
Figura 16 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) das amostras 1u e 4u em 10% D_2O



Fonte: a autora

Para as amostras 5m e 4u, por serem bebidas adoçadas da mesma marca e linha e diferirem apenas nos sabores e em alguns ingredientes, também foi realizada uma comparação dos espectros para avaliar a composição das amostras (Figura 17). Como resultado, elas apresentaram os mesmos sinais e, portanto, composições quase idênticas, sendo difícil visualizar as diferenças uma vez que todos os sinais se sobrepuseram. Variações foram observadas apenas na intensidade de alguns sinais, a exemplo o sinal do etanol em 1,17 ppm que foi mais intenso na amostra 4u.

Figura 17 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) das amostras 5m e 4u (bebidas adoçadas) em 10% D_2O



Fonte: a autora

5.3. Quantificação dos açúcares e etanol das amostras por RMN de ^1H

Os espectros obtidos para a quantificação dos açúcares e etanol de todas as amostras estão apresentados no Anexo D. A quantificação por RMN de ^1H (RMNq de ^1H) foi realizada pela integração dos sinais indicados na Tabela 3. A partir das áreas obtidas pela integração foram realizados o cálculo utilizando a equação (7):

$$C_x = \frac{RG_{std}}{RG_x} C_{std} \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{T_x}{T_{std}} \frac{P90_x}{P90_{std}} \frac{NS_{std}}{NS_x} \quad (7)$$

Onde, x se refere a amostra; std se refere a referência; RG é o ganho do

receptor; I é a área absoluta do sinal; N é o número de hidrogênios que formam o sinal; T é a temperatura; $P90$ é o pulso de 90°; e NS é o número de varreduras. O padrão de DMS foi utilizado como referência externa.

A partir da concentração obtida pela equação (7), foram realizadas as conversões necessárias obter o resultado em mg/mL e posteriormente em g/200mL (item 5.6), que é o volume de uma porção de suco apresentado nas tabelas nutricionais dos rótulos das bebidas.

Os dados da quantificação dos açúcares e etanol das amostras são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados das quantidades de açúcares e etanol nas amostras

Amostras	Etanol (mg/mL)	Frutose (mg/mL)	α-glicose (mg/mL)	β-glicose (mg/mL)	Sacarose (mg/mL)	Açúcares totais (mg/mL)
1m	0,43	15,55	8,55	16,32	7,37	47,79
2m	0,02	25,62	13,18	24,05	5,67	68,52
3m	0,21	18,99	8,44	16,20	10,99	54,62
4m	0,10	16,14	4,40	8,76	22,74	52,04
5m	0,16	3,59	2,97	5,67	63,83	76,06
1u	0,94	21,81	24,63	46,76	-	93,20
2u	0,34	19,65	22,03	41,85	-	83,53
3u	2,09	18,60	20,96	40,13	-	79,69
4u	0,53	3,78	4,11	7,91	58,21	74,01

Fonte: a autora

Com os sinais do RMN de ^1H foi possível quantificar os açúcares separadamente, frutose, sacarose, α -glicose e β -glicose, e ao somar os resultados obtidos foi possível obter o teor de açúcares totais.

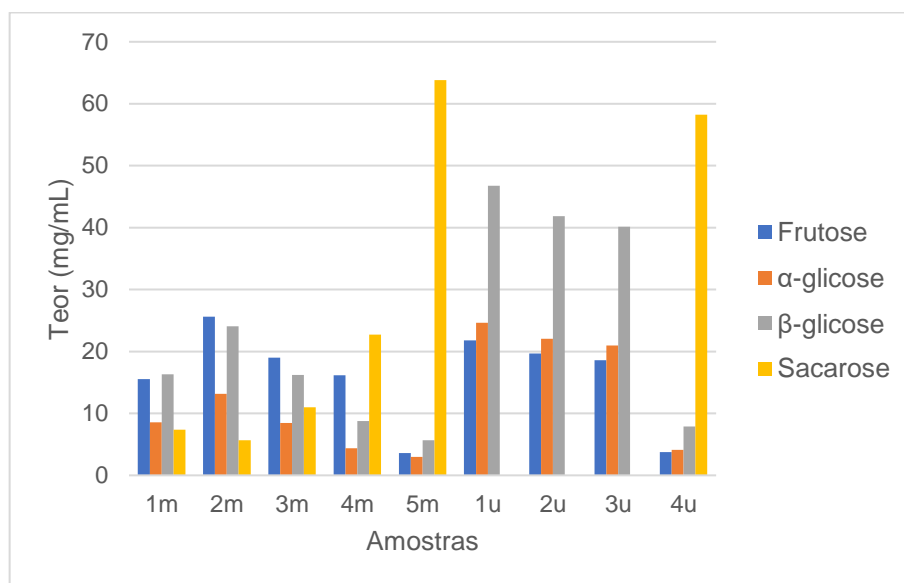
Os suco de uva (amostras 1u a 3u) contêm maior teor de açúcares totais, 53% a mais que os sucos de maçã (amostras 1m a 4m). Além disso, os sucos de uva apresentam maior quantidade de etanol, frutose, α - e β -glicose. Já as amostras de maçã tem os maiores teores de sacarose. Os teores de frutose foram semelhantes entre os sucos analisados.

Nas bebidas adoçadas de fruta, amostras 5m e 4u, foi observado um comportamento parecido em relação aos açúcares das amostras de sucos. A amostra 4u contém maior teor de etanol, frutose, α - e β -glicose, sendo o teor de frutose próximo

ao da amostra 5m. Porém, diferente do que foi observado nas amostras de sucos, a quantidade de sacarose foi maior na bebida de maçã adoçada (amostra 5m). Mesmo assim, as quantidades de açúcares totais foram próximas, indicando que os açúcares são adicionados nas bebidas de forma controlada para que todas as bebidas tenham a mesma quantidade final de carboidratos, não importando o sabor.

Para facilitar a comparação, os teores de açúcares individuais da Tabela 4 foram apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Gráfico da quantidade de açúcares das amostras



Fonte: a autora

Como mostra a Figura 18, a principal diferença verificada entre os teores de açúcares das amostras foi o teor de sacarose, sendo que as amostras, as 5m e 4u apresentaram os valores mais elevados. Para as amostras de suco de uva (1u, 2u e 3u) não foram detectados sinais referentes a esse carboidrato. Como explicado anteriormente, a sacarose pode ter sido transformado em glicose e frutose durante o amadurecimento da fruta, o que faz com esses dois últimos carboidratos sejam mais elevados nos sucos de uva.

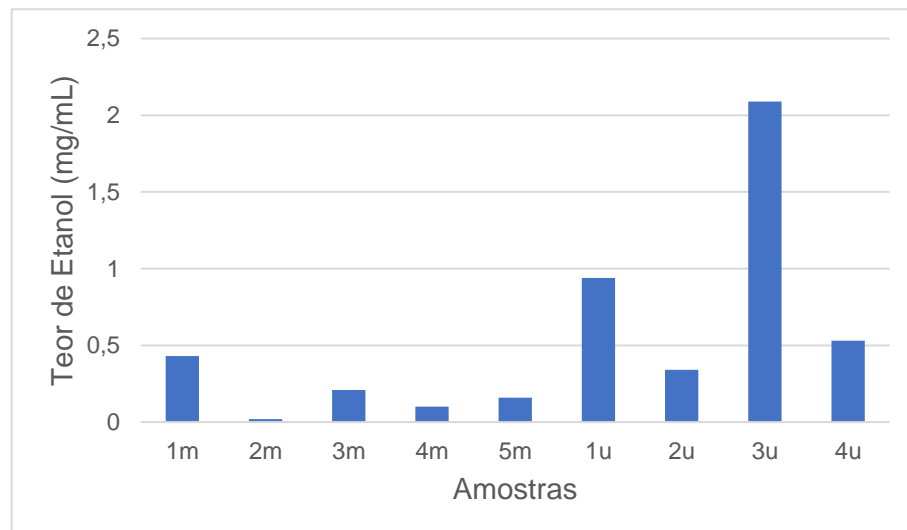
A amostra 4u apresentou o teor de sacarose mais elevado entre todas as amostras de uva, isso ocorreu por se tratar de uma bebida adoçada. Além disso, as amostras 5m e 4u apresentaram teores de carboidratos semelhantes. Essas bebidas são produtos da mesma marca e linha que foram adoçados com sacarose.

Provavelmente, a frutose e a glicose são provenientes das próprias frutas que compõem as bebidas e, como a concentração de suco das frutas nesses produtos era muito baixa, cerca de 10%, a concentração desses carboidratos também é baixa.

Outro fato observado foi a proporção entre os anômeros α e β da glicose. Em uma solução de glicose o equilíbrio entre eles é de 1/3 de α -glicose e 2/3 de β -glicose. Nas amostras analisadas, verificou-se que essa proporção ocorreu, a média foi de 34% α -glicose e 66% β -glicose, indicando que mesmo nas bebidas o equilíbrio entre as duas formas da glicose foi estabelecido. (NELSON e COX, 2019)

Todas as amostras de bebidas analisadas apresentaram etanol em sua composição. Entre todas as amostras, as bebidas de uva exibiram maiores teores de etanol (Figura 19), isso foi observado até mesmo na bebida adoçada (amostra 4u) que contém teores dos açúcares muito semelhantes à bebida 5m. Além disso, os sucos integrais (2m, 1u e 3u) tiveram o maior teor de álcool dentre os sucos, destacando a amostra 3u, que foi a amostra com maior quantidade de etanol de todas as amostras analisadas.

Figura 19 - Teores de etanol das amostras analisadas



Fonte: a autora

Segundo o decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, a bebida só é considerada alcoólica quando tem mais de 0,5% (v/v) de álcool etílico em sua composição, o que significa que a bebida deve ter teor mínimo 4 mg/mL de etanol em sua composição (BRASIL, 2009). Todas as amostras possuíam teor de etanol menor que 4 mg/mL,

isso significa que nenhuma das bebidas poderia ser considerada alcoólica.

5.4. Teste de estabilidade das amostras

Os testes de estabilidade foram realizados após seis dias da abertura da embalagem das amostras. A amostra 2m foi preparada seguindo o preparo de amostra listado no item 4.2. Para as demais bebidas, os espectros de RMN de ^1H foram obtidos para as amostras que já estavam no tubo de RMN. Para identificar os resultados de estabilidade, as amostras terão seu nome acrescido pelo apóstrofo após a letra minúscula referente ao sabor da bebida (m' ou n').

A partir dos espectros obtidos, realizou-se a quantificação dos sinais dos açúcares individuais e do etanol das amostras de estabilidade. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados das quantidades de açúcares e etanol nas amostras do teste de estabilidade

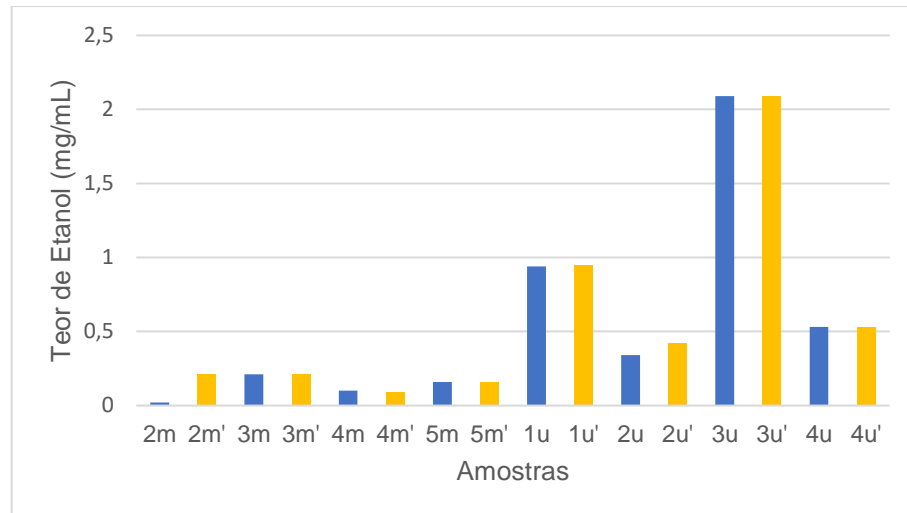
Amostra	Etanol (mg/mL)	Frutose (mg/mL)	α-glicose (mg/mL)	β-glicose (mg/mL)	Sacarose (mg/mL)	Açúcares totais (mg/mL)
2m'	0,21	24,57	11,55	22,18	4,63	62,93
3m'	0,21	17,94	8,58	16,55	10,80	53,87
4m'	0,09	15,78	4,78	9,13	22,65	52,34
5m'	0,16	3,57	3,39	6,43	62,61	76,00
1u'	0,95	20,52	24,60	46,52	-	91,64
2u'	0,42	18,94	21,81	41,92	-	82,67
3u'	2,09	18,61	21,08	40,17	-	79,86
4u'	0,53	4,06	4,69	8,93	56,11	73,79

Fonte: a autora

Entre todas as amostras, o suco 2m' apresentou mudanças mais significativas, destacando o aumento do teor de etanol e diminuição das quantidades de açúcares individuais e, conseqüentemente, dos açúcares totais. As outras amostras exibiram pouca ou nenhuma mudança nos teores de etanol e açúcares, indicando que permaneceram estáveis após os seis dias. Cabe destacar que essas amostras foram aquelas que permaneceram armazenadas no tubo de RMN. Provavelmente a condição de armazenamento influenciou nos resultados. Dentre as amostras que permaneceram no tubo de RMN, a amostra 2u' apresentou um maior aumento no teor de etanol do que as outras.

A comparação dos resultados do teor de etanol de todas as amostras analisadas está apresentada na Figura 20.

Figura 20 - Gráfico da comparação dos teores de etanol nas amostras

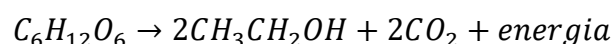


Fonte: a autora

As amostras 2m' e 2u' apresentaram maiores variações nos seus teores de etanol quando comparadas as suas primeiras análises 2m e 2u. A amostra 2m' mostrou um aumento no teor de etanol de 950%. Isso significa que a quantidade de etanol aumentou quase 10 vezes. Já na amostra 2u', o aumento da quantidade de etanol foi de 23,5%, mostrando que a condição de armazenamento pode ter influência na estabilidade da amostra. As demais amostras não sofreram mudanças significativas no teor de etanol como pode ser observado na Figura 20.

O aumento no teor de etanol observado ocorreu provavelmente pela fermentação alcoólica, que é um processo anaeróbico e, portanto, ocorre na ausência de oxigênio, e é capaz de transformar carboidratos em etanol e gás carbônico para produção de energia celular, sendo realizado por bactérias e leveduras. (PINHEIRO, 2011; NELSON e COX, 2019)

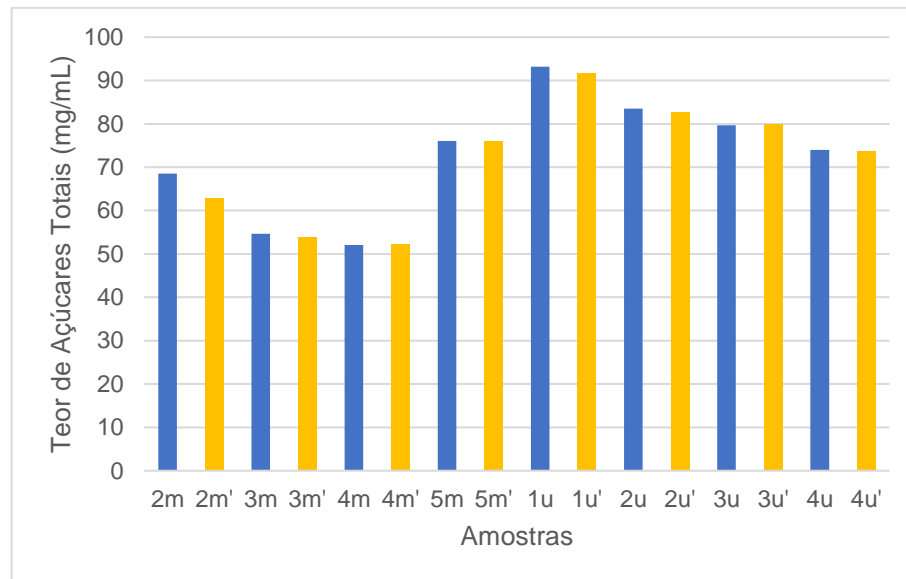
Pela equação química da fermentação alcoólica, apresentada abaixo, um mol de glicose gera dois mol de etanol e dois mol de gás carbônico. (PINHEIRO, 2011; NELSON e COX, 2019)



O consumo dos açúcares totais presentes nas amostras para a formação de

etanol pode ser observado na Figura 21.

Figura 21 - Gráficos dos teores de açúcares totais nas amostras



Fonte: a autora

Quando se analisa os resultados obtidos (Figura 21), observa-se que a amostra 2m' apresentou o maior consumo de carboidratos, confirmado pela maior formação de etanol (Figura 20).

A fermentação alcoólica é influenciada por diversos fatores, sendo a temperatura um dos mais importantes, a temperatura ideal para os microrganismos é em torno de 30 °C. Então, temperaturas muito baixas retardam a fermentação e temperaturas muito elevadas podem causar danos as leveduras. Por esse motivo os fabricantes indicam que as bebidas sejam armazenadas na geladeira após abertas e consumidas em poucos dias, retardando a fermentação alcoólica. (PINHEIRO, 2011)

5.5. Refratometria

Para comparar os resultados obtidos por RMN com outra técnica, foram realizadas análises de refratometria. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6, juntamente com os teores de açúcares totais obtidos pela técnica de RMN. Os dados apresentados foram corrigidos utilizando as tabelas disponíveis no manual do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), pois a amostra estava na temperatura de 23 °C. Depois da temperatura corrigida, o índice de refração pode

ser convertido em graus Brix ou quantidade de açúcar através de tabelas de conversão, nesse caso se utilizou quantidade de açúcar. (USDA, 2020)

Tabela 6 - Teores de açúcares totais obtidos por refratometria e RMNq

Amostras	Teor de Açúcares Totais (mg/mL)	
	Refratometria	RMNq
3m	114,55	54,62
4m	97,30	52,04
5m	89,75	76,06
1u	156,85	93,20
2u	146,43	83,53
3u	135,40	79,69
4u	89,75	74,01

Fonte: a autora

Como pode ser observado na Tabela 6, os teores obtidos através da técnica de refratometria são muito maiores do que os resultados obtidos pela técnica de RMNq. Isso pode ser explicado pelo fato da refratometria ser afetada por todos os sólidos solúveis presentes nas amostras, tais como proteínas, sais, ácidos e açúcares. (USDA, 2020). Como as bebidas foram homogeneizadas manualmente antes da realização das análises, para garantir que as amostras fossem representativas, aquelas que continham sólidos no fundo, característicos dos sucos integrais (1u e 3u), mas também presentes nos sucos 100% de fruta (3m, 4m e 2u) podem ter tido seu resultado influenciado, levando a resultados maiores de teores de açúcares totais.

Mas é interessante destacar que as tendências observadas a partir da quantificação por RMNq foram também vistas nas medidas utilizando refratometria. Como as amostras de uva (1u, 2u, 3u) obtiveram maior quantidade de açúcar total que as amostras de maçã e as amostras 5m e 4u apresentaram o mesmo teor de açúcares totais, indicando que a adição desses carboidratos é controlada para que todas as bebidas, mesmo de sabores diferentes, contenham a mesma quantidade de açúcar no final.

Como a refratometria considera todos os sólidos presentes na amostra, se ela contiver grandes concentrações de outros sólidos que não sejam açúcares, eles irão ser contabilizadas na análise e o resultado obtido será maior que a quantidade real de açúcar. Por esse motivo, não é uma técnica muito exata e pode ser influenciada pelas características e composição da amostra analisada. Diferente da refratometria, a

técnica de RMN não é influenciada por nenhuma outra substância presente na amostra, uma vez que para realização da quantificação são escolhidos apenas os sinais referentes as moléculas analisadas, nesse caso, os açúcares. Além disso, o RMN possibilita identificar, diferenciar e quantificar os açúcares individuais (frutose, sacarose, α - e β -glicose), permitindo o entendimento e conhecimento profundo da composição da amostra com relação àqueles carboidratos. Essas características tornam a técnica de RMN precisa e exata.

5.6. Comparação com os rótulos das bebidas

Nos rótulos dos produtos alimentícios, as quantidades de carboidratos, proteínas, gorduras e outros ingredientes presente devem ser expressas em relação à porção daquele alimento, onde porção é a quantia do alimento recomendada para ser consumida por ocasião. No caso das bebidas, a porção mais comum é um copo ou 200 mL da bebida e a quantidade de carboidrato é expressa em gramas, tendo assim, a unidade g/200 mL. (BRASIL, 2003b)

Assim, para facilitar a comparação entre as técnicas utilizadas e o rótulo das bebidas, foram destacados apenas as quantidades de açúcares totais, única informação disponível nos rótulos, e os teores adquiridos experimentalmente foram convertidos para g/200 mL de bebida. Essas quantidades estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Comparação das quantidades de açúcares totais obtidas por RMNq, refratometria e rótulo das bebidas

Amostras	Quantidade de Açúcares Totais (g/200 mL)		
	RMNq	Refratometria	Rótulo
1m	9,56	-	18
2m	13,70	-	24
3m	10,92	22,91	19
4m	10,41	19,46	22
5m	15,21	17,95	19
1u	18,64	31,97	28
2u	16,71	29,29	25
3u	15,94	27,08	26
4u	14,80	17,95	19

Fonte: a autora

Todas as quantidades de açúcares totais obtidas através da quantificação por

RMN foram menores que as quantias apresentadas nos rótulos. Ao contrário, os valores dos rótulos e os obtidos por refratometria foram mais próximos.

A resolução RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003, emitida pela Anvisa, permite uma variação de $\pm 20\%$ com relação aos valores declarados no rótulo (BRASIL, 2003b). As diferenças entre as quantidades de açúcares totais entre as técnicas e o rótulo estão apresentadas na Tabela 8. Onde as diferenças negativas, representam que a técnica obteve um valor menor que o do rótulo e as positivas maior.

Tabela 8 - Comparação entre os valores de açúcares totais obtidos a partir das técnicas de RMNq e refratometria e o rótulo

Amostras	Diferença entre as técnicas e rótulo (%)	
	Rótulo e refratometria	Rótulo e RMNq
1m	-	-47
2m	-	-43
3m	21	-43
4m	-12	-53
5m	-6	-20
1u	14	-33
2u	17	-33
3u	4	-39
4u	-6	-22

Fonte: a autora

Comparado as quantidades de açúcares obtidos pela refratometria e as do rótulo, apenas a amostra 3m tem uma variação de 21%. As demais apresentaram variação menor que o limite permitido pela legislação, com isso, se a técnica utilizada nas fábricas para a quantificação dos açúcares totais nas bebidas for a refratometria a variação encontrada estaria dentro do parâmetro estabelecido pela lei brasileira, exceto da amostra 3m.

A diferença entre os valores obtidos pela refratometria e o rótulo poderia ser explicada por algum processo realizado antes da análise nas fábricas, como a filtração das bebidas. Nesse experimento não foi realizado nenhum preparo de amostra para garantir que ela fosse o mais fiel possível ao todo, assim os sólidos não solúveis que costumam aparecer em sucos integrais e 100% podem ter influenciado no resultado da análise.

Ao se comparar os valores obtidos a partir da técnica de RMNq e o rótulo, todos

os resultados de RMNq apresentaram teores menores que os descritos nos rótulos, com variações maiores que 20%. Apenas na amostra 5m a diferença é de exatamente 20%. Isso pode ter ocorrido uma vez que essa bebida era bastante homogênea e não apresentou sólidos que são característicos dos sucos integrais, assim o valor obtido através da técnica de refratometria e disposto do rótulo foi mais próximo ao real e ao encontrado pela técnica de RMNq. Já a amostra 4m apresentou a maior variação, sendo que a quantificação por RMNq obteve um teor 53% menor do que o apresentado no rótulo.

Essas diferenças entre os resultados da quantificação dos açúcares totais obtidos por RMNq e os valores dos rótulos das amostras pode ter ocorrido pela técnica utilizada pelas indústrias para esse fim, a refratometria, que considera todos os sólidos solúveis presentes na bebida, como açúcar, ácidos, sais e outros. Assim a medida é influenciada por outras substâncias além dos carboidratos presentes. Já por meio da técnica de RMNq é possível quantificar apenas os carboidratos desejados, nesse caso, frutose, α - e β -glicose e sacarose, expressando a quantidade real de açúcar contida nas amostras.

Outra vantagem do RMNq é a possibilidade de diferenciar os carboidratos presentes na amostra, como mostrado na Tabela 4, e assim poder quantificá-los separadamente. Os teores dos carboidratos individuais é uma informação importante uma vez que é possível avaliar a quantidade e identificar o carboidrato que está em excesso, como no caso das bebidas 5m e 4u desse trabalho.

6. CONCLUSÃO

Utilizando a técnica de RMNq de ^1H foi possível obter os espectros de RMNq de ^1H das amostras das bebidas de suco integral, 100% e bebida adoçada de maçã e uva de diferentes marcas, utilizando-se a sequência de pulso noesygppr1d. Por meio dos espectros obtidos, foi possível identificar os açúcares, sacarose, frutose, α -glicose e β -glicose e quantificá-los em todas as amostras. Os açúcares α - e β -glicose e frutose estavam presentes em todas as amostras. Os sucos integrais e 100% de uva não foi identificado a sacarose em sua composição. Já na bebida adoçada de uva detectou-se o sinal referente a sacarose, indicando que esse açúcar é utilizado para adoçá-la.

Por meio dos espectros de RMNq de ^1H também foi possível identificar a presença de etanol em todas as amostras, principalmente nos sucos integrais e de uva, formado pela fermentação alcoólica dos açúcares presentes. Além disso, o teste de estabilidade mostrou que a condição de armazenamento da bebida poderia aumentar essa fermentação. Entretanto, as bebidas não foram consideradas alcoólicas, pois as quantidades de etanol presentes estavam abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira.

Através da técnica de refratometria obteve-se resultados de teores de açúcares bem próximos aos apresentados nos rótulos dos produtos analisados, uma vez que a técnica considera todos os sólidos solúveis presentes na amostra analisada. Já os resultados obtidos por meio da técnica de RMN apresentam valores de teores de açúcar menores do que aqueles apresentados no rótulo da embalagem, já que apenas os açúcares sacarose, frutose, α -glicose e β -glicose são quantificados por essa técnica.

Apesar da técnica de refratometria apresentar resultados mais próximos aos trazidos nos rótulos das embalagens pela indústria, conclui-se que a técnica de RMNq de ^1H é mais específica, pois possibilita identificar e quantificar os açúcares em uma amostra de maneira simultânea, além disso, de determinar o teor de outros componentes do suco, como foi o caso do etanol.

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas (ABIR). O setor de bebidas não alcoólicas frente à pandemia da COVID-19. **Revista ABIR**, Edição 2020/2021, p. 42-43, 2021. Disponível em: https://abir.org.br/abir/wp-content/uploads/2021/03/Revista_Abir_2021-web.pdf. Acesso em: 26 dez. 2022
- ASSOCIAÇÃO Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO). Mapa da Obesidade, 2020. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>. Acesso em: 28 dez. 2022
- AVENA, Nicole M.; RADA, Pedro; HOEBEL, Bartley G. Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 1, p. 20-39, 2008. ISSN 0149-7634. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.04.019>. Acesso em: 12 nov. 2022
- BARREIROS, André Luís Bacelar Silva; BARREIROS, Marizeth Libório. Carboidratos. In: **Química de Biomoléculas**. São Cristóvão, Universidade Federal de Sergipe – CESAD, 2012. *E-book*. Disponível em: https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/12173810072012Quimica_Biomoleculas_aula_1.pdf. Acesso em: 29 nov. 2022
- BARREIROS, Rodrigo C.; BOSSOLAN, Grasiela; TRINDADE, Cleide E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005. ISSN 1678-9865. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732005000300010>. Acesso em: 27 out. 2022
- BENEDITO, Luiz Eduardo Celino. **Caracterização de Amostras de Cocaína por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H**. 2018. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/34172>. Acesso em: 09 nov. 2022
- BETTA, Fabiana Della *et al.* Determinação de açúcares em sucos de frutas utilizando eletroforese capilar. In: **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v. 1, n. 1, 2015. Disponível em: <https://www.revistas.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/6753>. Acesso em: 28 dez. 2022
- BRASIL. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União. Brasília, DF, p. 20–29. 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm. Acesso em: 14 nov. 2022
- BRASIL. **Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994**. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p. 1-2, 1994. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8918.htm. Acesso em: 14 nov. 2022
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 24, de 8 de setembro de 2005**. Diário Oficial da União: seção 1, p.

11, Brasília, DF, 2005. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/752103/pg-11-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-20-09-2005>. Acesso em: 23 jun. 2023

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 12, de 4 de setembro de 2003**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 2–5, 2003a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-12-de-4-de-setembro-de-2003.pdf/view>. Acesso em: 28 out. 2022

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 429, de 8 de outubro de 2020**, dispõe sobre a rotulagem nutricional dos alimentos embalados. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 106-110, 2020. Disponível em: <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/321055239/dou-secao-1-09-10-2020-pg-106>. Acesso em: 22 jun. 2023

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002**. Diário oficial da União, Brasília, DF, n. 184, p. 33–34, 2002. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2002/rdc0259_20_09_2002.html. Acesso em: 28 out. 2022

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003**. Dispõe sobre Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 251, 2003b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-360-de-23-de-dezembro-de-2003.pdf/view>. Acesso em: 28 out. 2022

Brix Measurement. *In*: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Technical Procedures Manual**, 2020, p. 17–31. Disponível em: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/TechnicalProceduresManual.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2023

CALDAS, Bárbara Sthéfani *et al.* Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 53–63, 2015. ISSN 1984-4433. Disponível em: <https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v7n1a03.pdf>. DOI 10.4322/sc.2015.016. Acesso em: 14 out. 2022

DEBIASI, Julia Baggio. **Autenticidade e controle de qualidade de sucos de uva utilizando ressonância magnética nuclear ¹H – metabolômica aplicada a avaliação de adulteração**, 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ucs.br/xmlui/handle/11338/8533?locale-attribute=de>. Acesso em 25 nov. 2022

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. da; SILVA, F. C. da. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova** [online], v.

32, n. 3, p. 623-638, 2009. ISSN 1678-7064. Disponível em:
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300007>. Acesso em: 03 dez. 2022

FREEMAN, Clara R *et al.* Impact of sugar on the body, brain, and behavior. **Frontiers In Bioscience (Landmark edition)**, v. 23, n. 12, p. 2255–2266, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2741/4704>. Acesso em: 12 nov. 2022

GAINO, Natalia Moreno; SILVA, Mariana Vieira da. Consumo de frutose e impacto na saúde humana. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, SP, v. 18, n. 2, p. 88-98, 2015. DOI 10.20396/san.v18i2.8634681. Disponível em:
<https://doi.org/10.20396/san.v18i2.8634681>. Acesso em: 03 dez. 2022

GUIMARAES, Cainne Alves. **Aplicações de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Quimiometria na Determinação da Autenticidade de Uísques**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019. Disponível em:
<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/9749#:~:text=Ao%20realizar%20uma%20an%C3%A1lise%20de,nas%20composi%C3%A7%C3%B5es%20de%20bebidas%20falsificadas>. Acesso em: 28 nov. 2022

INTERNATIONAL Sugar Organization (ISO). **About Sugar: The Sugar Market, 2022**. Disponível em: <https://www.isosugar.org/sugarsector/sugar>. Acesso em: 28 nov. 2022

JAPUR, Camila Cremonesi *et al.* Disponibilidade de informação sobre quantidade de açúcar em alimentos industrializados. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 03, p. 1153-1162, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-81232021263.07872019>. Acesso em: 27 out. 2022

MANHANI, Tatiana Monique *et al.* Sacarose: Suas Propriedades e os Novos Edulcorantes. **Revista Brasileira Multidisciplinar – ReBraM**, v. 17, n. 1, p. 113–125, 2014. DOI: 10.25061/2527-2675/ReBraM/2014.v17i1.12. Disponível em:
<https://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/12>. Acesso: 27 out. 2022

MERCK. **Ressonância magnética nuclear (RMN)**. Disponível em:
<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/analytical-chemistry/nuclear-magnetic-resonance>. Acesso em: 20 nov. 2022

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Secretaria de Atenção Primária à Saúde (SAPS). **Saúde promove conscientização sobre o consumo de açúcar em webnário, 2022**. Disponível em:
<https://aps.saude.gov.br/noticia/15359#:~:text=Os%20brasileiros%20consomem%2050%25%20a,adulto%20%C3%A9%20de%2012%20colheres>. Acesso em: 28 nov. 2022

NAVARRO, Yolanda *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. Disponível em:
<https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00651>. Acesso em: 05 out. 2022

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 7ª ed. Grupo A, 2019. *E-book*. ISBN 9788582715345. Disponível em:
<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715345/>. Acesso: 15 nov.

2022

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Alimentação saudável**, 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/alimentacao-saudavel>. Acesso em: 09 jan. 2023

PAVIA, Donald. L *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 5ª ed. Cengage Learning Brasil, 2016. E-book. ISBN 9788522123391. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788522123391/>. Acesso em: 11 nov. 2022

PINHEIRO, Álvaro Daniel Teles. **Fermentação Alcoólica do Suco de Caju (*Anacardium occidentale* L.): Influência de Condições Operacionais**. 2011. Tese (mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/3680>. Acesso em: 18 jun. 2023

PIRILLO, Camila P.; SABIO, Renata P. 100% Suco: Nem tudo é suco nas bebidas de frutas. **Revista Hortifruti Brasil**, v. 81, p. 6-12, 2009. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/100-suco-nem-tudo-e-suco-na-bebida-de-frutas.aspx>. Acesso em: 28 dez. 2022

RAMASAMI, Ponnadurai *et al.* Quantification of sugars in soft drinks and fruit juices by density, refractometry, infrared spectroscopy and statistical methods. **South African Journal of Chemistry**, v. 57, 2004. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/sajc/article/view/21572>. Acesso em: 20 jun. 2023

RAO, Vallurupalli S. Raghavendra. *et al.* Configuration of Monosaccharides. *In: Conformation of Carbohydrates*, 1st ed. Londres: Ed. CRC Press, 2019. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780367813529>. Acesso em: 25 nov. 2022

RODRIGUES, Deyse Pegorini *et al.* Simultaneous determination of organic acids and sugars in fruit juices by High performance liquid chromatography: characterization and differentiation of commercial juices by principal component analysis. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200629>. Acesso em: 20 jun. 2023

RUNDLÖF, Torgny *et al.* Survey and qualification of internal standards for quantification by ¹H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 645–651, 2010. ISSN 0731-7085. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.007>. Acesso em: 05 out. 2022

SANTANA, Mábio João. **O Uso da Ressonância Magnética Nuclear na Análise do Perfil Químico de Sucos de Uva do Tipo Integral e Néctar**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/8101>. Acesso em: 03 abr. 2023

SANTOS, Maiara da S.; COLNAGO, Luiz Alberto. Validação de Método Quantitativo por RMN de ¹H para Análise de Formulações Farmacêuticas. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013. ISSN 1678-7064. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200020>. Acesso em: 28 nov. 2022

SERRANO, Julia Neves Prates. **Caracterização e quantificação de novas substâncias psicoativas por ressonância magnética nuclear**. 2019. Tese (mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília,

DF, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/35620>. Acesso em: 18 dez. 2022

SILVA, B. M *et al.* Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão. **CYTA-Journal of Food**, v. 2, n. 4, p. 184–191, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/11358129909487600>. Acesso em: 25 nov. 2022

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ASQUIERI, E. R. Avaliação de métodos químicos para determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. **Infarma**, v. 11, n. 9/10, p. 47-50, 1999. Disponível em: <https://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=981&path%5B%5D=756>. Acesso em: 21 jun. 2023

SILVERSTEIN, Robert M. *et al.* **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 8ª ed. Ed. LTC: Grupo GEN, 2019. *E-book*. ISBN 9788521636465. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521636472/>. Acesso em: 11 nov. 2022

TAVARES, José Torquato de Queiroz *et al.* Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**, v. 33, p. 805-809, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000400008>. Acesso em: 21 jun. 2023

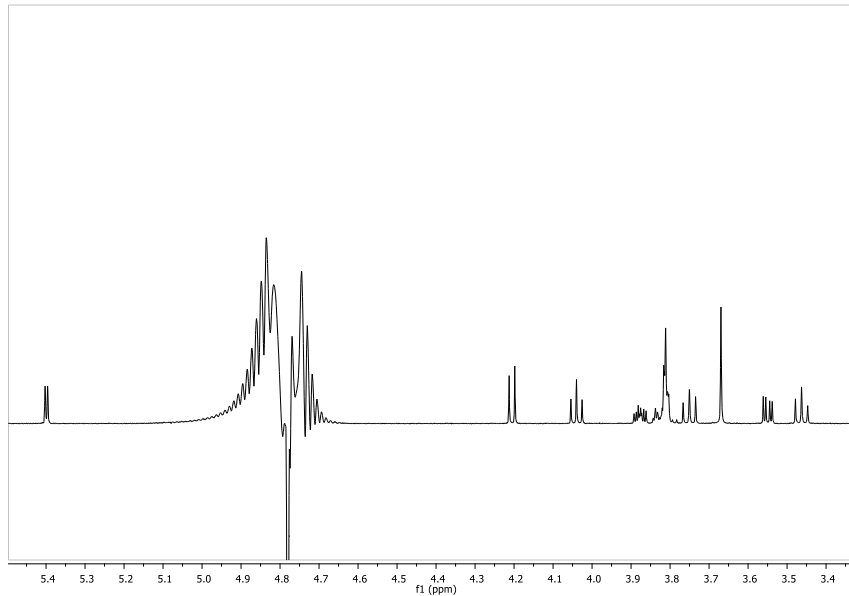
UNIMED. **Alimentação saudável**, 2017. Disponível em: <https://www.unimed.coop.br/viver-bem/alimentacao/dez-dicas-para-uma-alimentacao-saudavel>. Acesso em: 09 jan. 2023

WANG, Zhi-Fan *et al.* Research Progress of NMR in Natural Product Quantification. **Molecules**, v. 26, n. 20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26206308>. Acesso em: 05 out. 2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guideline: Sugars Intake for Adults and Children**. Genebra, Suíça: World Health Organization; 2015. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549028>. Acesso em: 02 nov. 2022

ANEXOS

ANEXO A – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) do padrão certificado e selado de sacarose da Bruker contendo 2,0 mmol/L de sacarose, 0,5 mmol/L de DSS, NaN_3 2,0 mmol/L, D_2O a 10% e 90% de H_2O



ANEXO B – Espectros de ^1H , ^{13}C , HSQC e HMBC da amostra 1m

Figura B1 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz) da amostra 1m em 10% D_2O

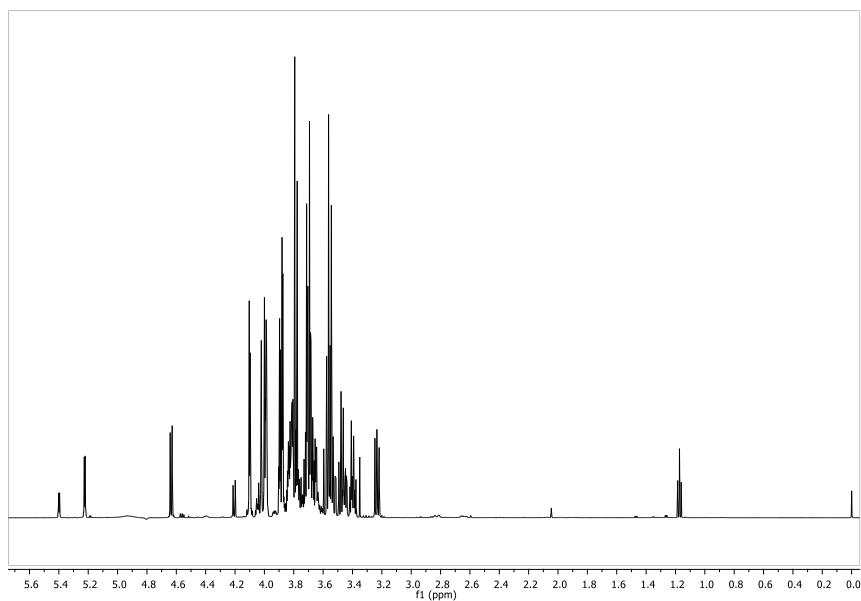


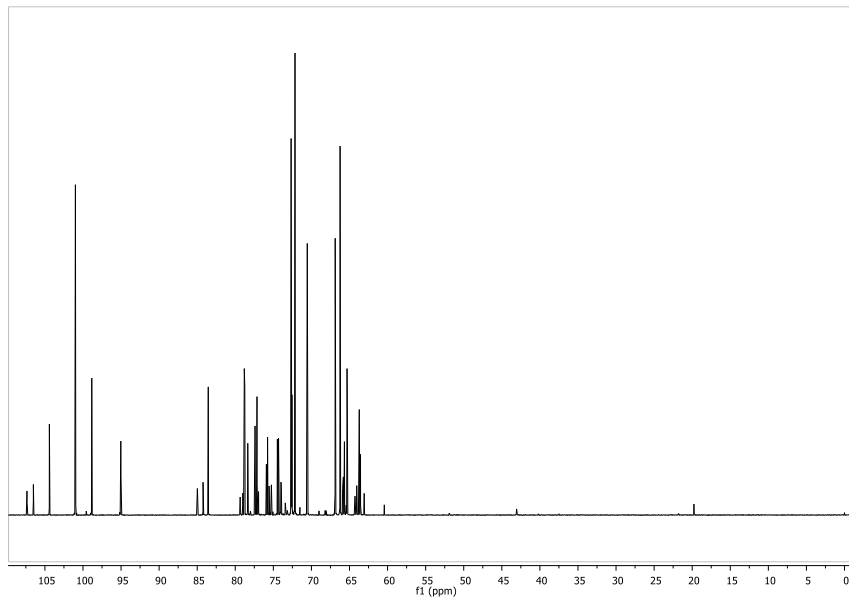
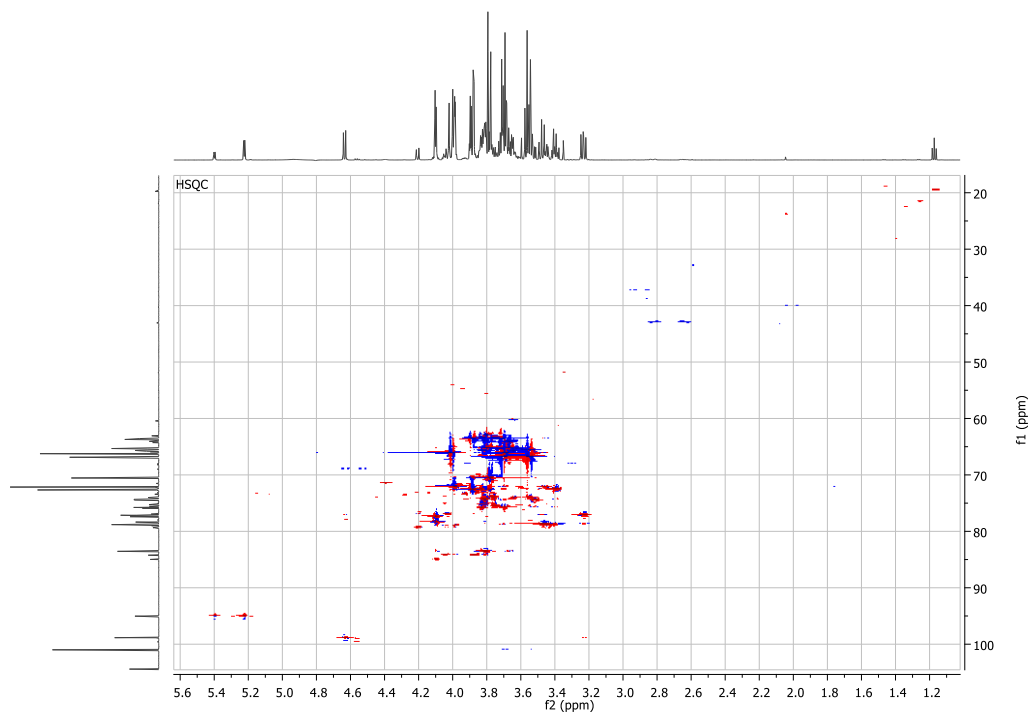
Figura B2 – Espectro de RMN de ^{13}C (600 MHz) da amostra 1m em 10% D_2O Figura B3 – Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC (600 MHz) da amostra 1m em 10% D_2O 

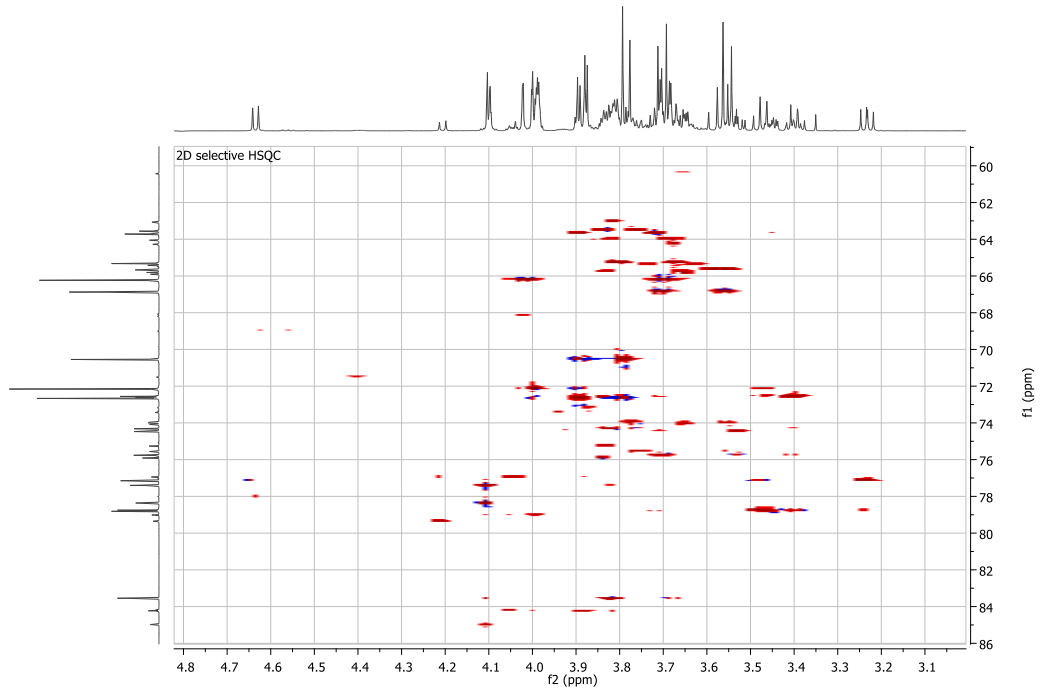
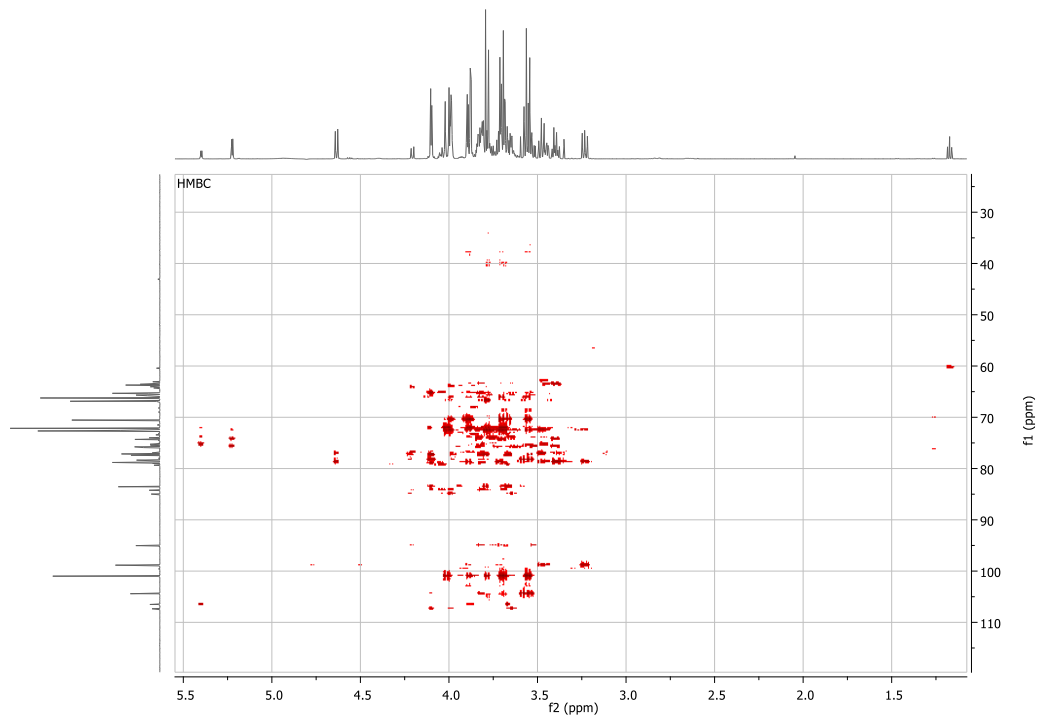
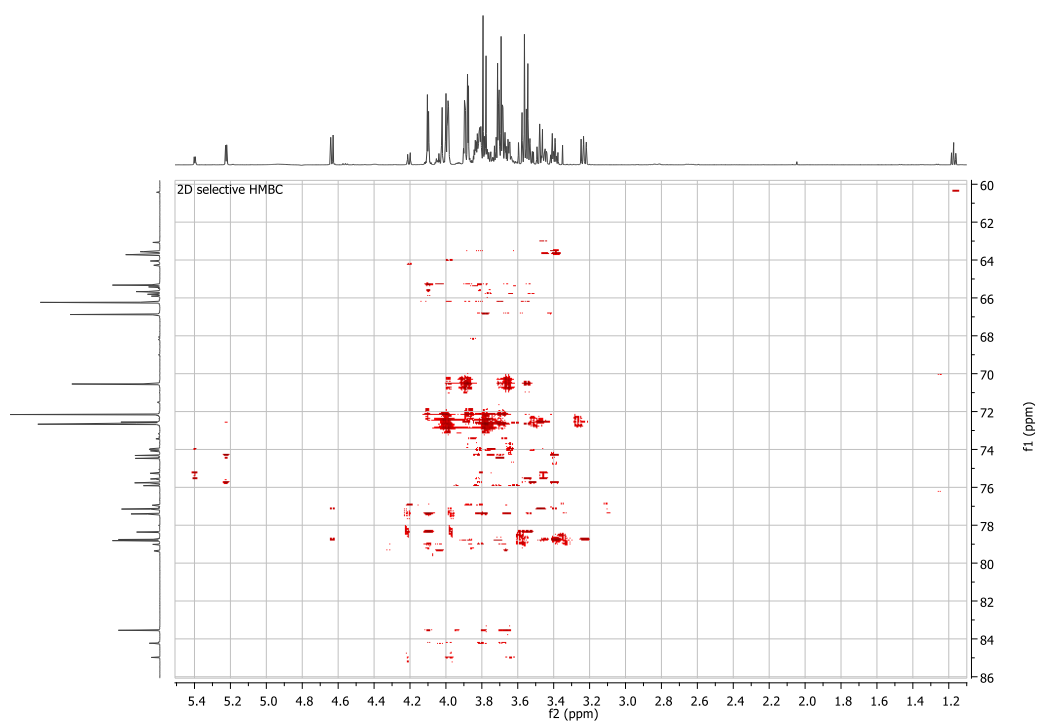
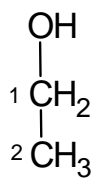
Figura B4 – Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC (600 MHz) seletivo da amostra 1m em 10% D_2O Figura B5 – Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HMBC (600 MHz) da amostra 1m em 10% D_2O 

Figura B6 – Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HMBC (600 MHz) seletivo da amostra 1m em 10% D_2O 

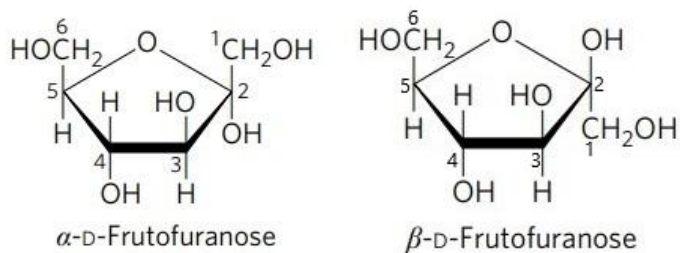
ANEXO C – Atribuição dos sinais de RMN

Tabela C1 – Sinais do etanol



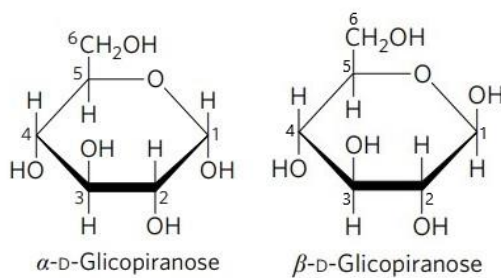
Numeração	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC (C→H)
1	1,17	t	7,08	19,77	2
2	3,65	-	-	60,43	1

Tabela C2 – Sinais da Frutose



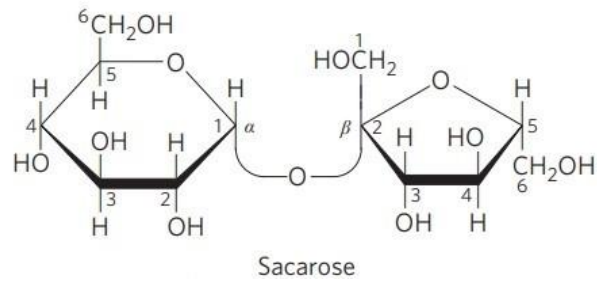
	Numeração	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	HMBC (C→H)
α-frutose	1	3,65	-	-	-	-
	2	-	-	-	107,4	1, 3, 4
	3	4,1	-	-	84,2	1, 4
	4	3,99	-	-	79,0	3, 5, 6
	5	4,05	-	-	84,6	3, 4, 6
	6	3,69 e 3,82	-	-	-	-
β-frutose	1	3,54 e 3,58	-	-	65,7	3
	2	-	-	-	104,4	1, 3, 4, 5
	3	4,1	m	-	78,4	1, 4, 5
	4	4,1	m	-	77,4	3, 5, 6
	5	3,83	-	-	83,6	3, 4, 6
	6	3,66 e 3,83	-	-	-	-

Tabela C3 – Sinais da α-glicose



	Numeração	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	HMBC (C→H)
α-glicose	1	5,22	d	3,83	95,0	2, 3, 5
	2	3,52	-	-	74,5	1, 3, 4
	3	3,72	-	-	75,8	1, 2, 4, 5
	4	3,40	-	-	72,6	3
	5	3,83	-	-	74,3	1, 3, 4, 6
	6	3,85	-	-	63,6	4, 5
β-glicose	1	4,63	d	7,97	98,8	2, 3, 5
	2	3,23	dd	9,57 e 7,98	77,2	1, 3, 4
	3	3,47	-	-	78,8	1, 2, 4, 5
	4	3,40	-	-	72,6	3, 5
	5	3,47	-	-	78,8	1, 4, 3
	6	-	-	-	-	-

Tabela C4 – Sinais da Sacarose



Porção	Numeração	δ ^1H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC (C \rightarrow H)
Glicose	1	5,39	d	3,84	95,0	2, 3, 5, 6
	2	3,53	-	-	74,5	-
	3	3,75	-	-	75,6	1, 2, 4, 5
	4	3,46	-	-	72,2	3, 5, 6
	5	3,83	-	-	75,3	1, 4, 6
	6	3,81	-	-	-	-
Frutose	1	3,67	-	-	64,3	3
	2	-	-	-	106,5	1, 3, 5
	3	4,20	d	8,79	79,4	1,4
	4	4,04	-	-	76,9	3, 5, 6
	5	3,88	-	-	-	-
	6	3,81	-	-	65,3	4

ANEXO D – Espectros de RMN de ^1H (600 MHz) das amostras em 10% D $_2\text{O}$

Figura D1 – Amostra 2m (Suco Integral – Organobio)

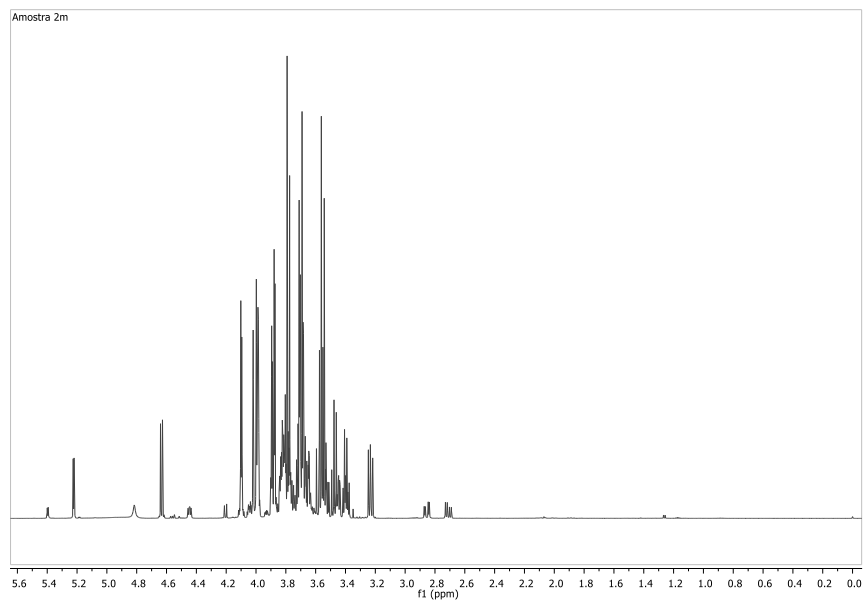


Figura D2 – Amostra 3m (Suco 100% - Yakult)

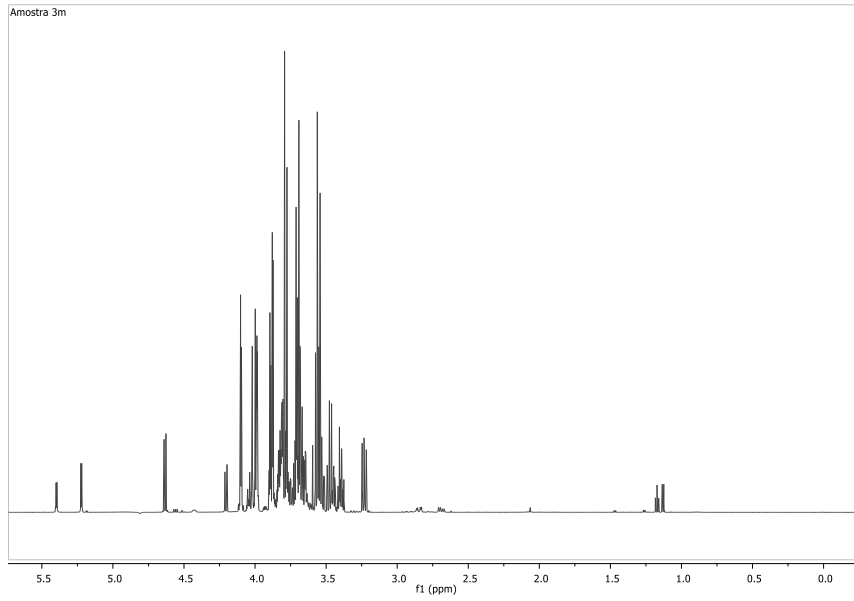


Figura D3 – Amostra 4m (Suco 100% - Natural One)

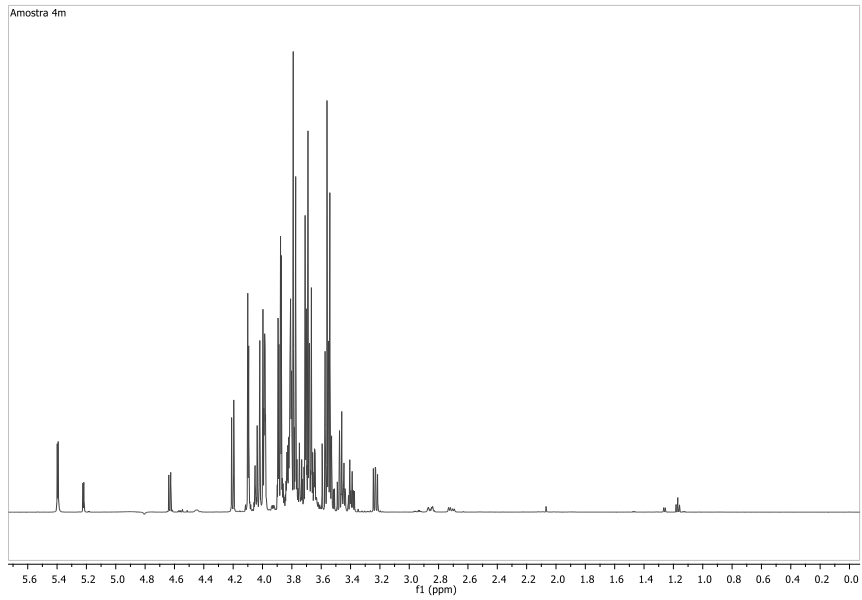


Figura D4 – Amostra 5m (Bebida de fruta adoçada sabor maçã - Kapo)

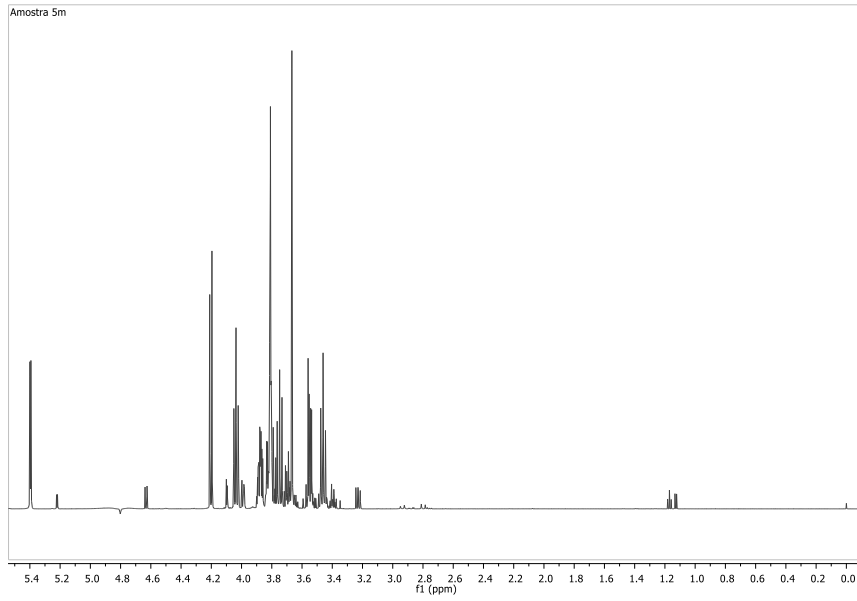


Figura D5 – Amostra 1u (Suco Integral – Aliança)

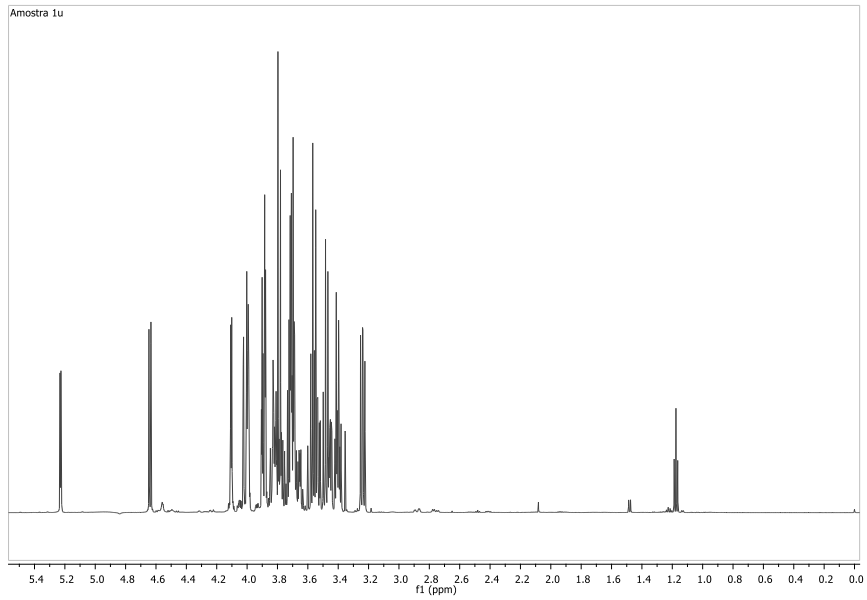


Figura D6 – Amostra 2u (Suco 100% - Tial)

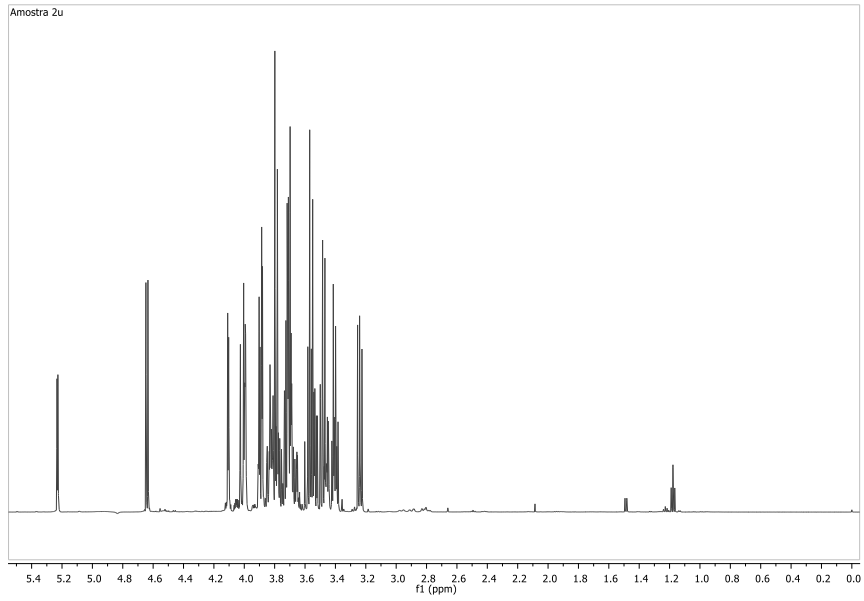


Figura D7 – Amostra 3u (Suco Integral – Pleno)

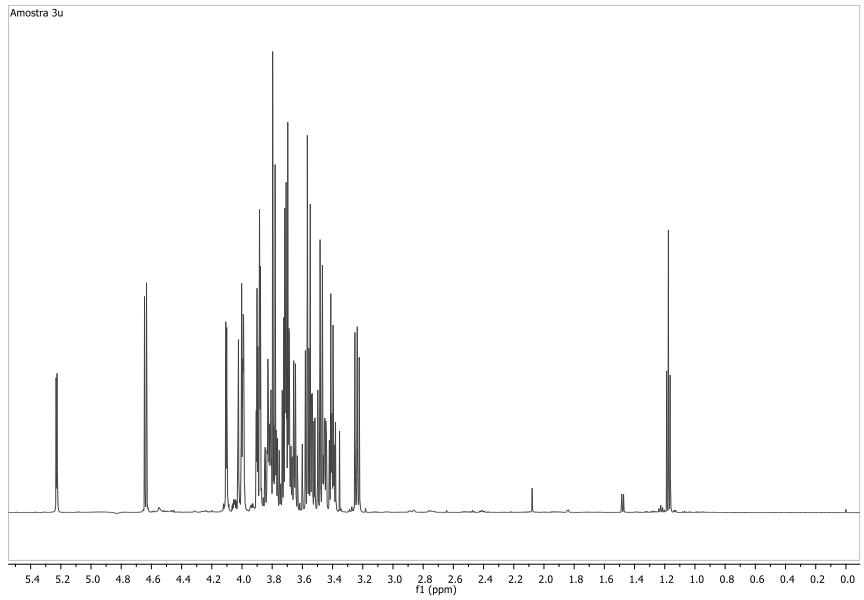
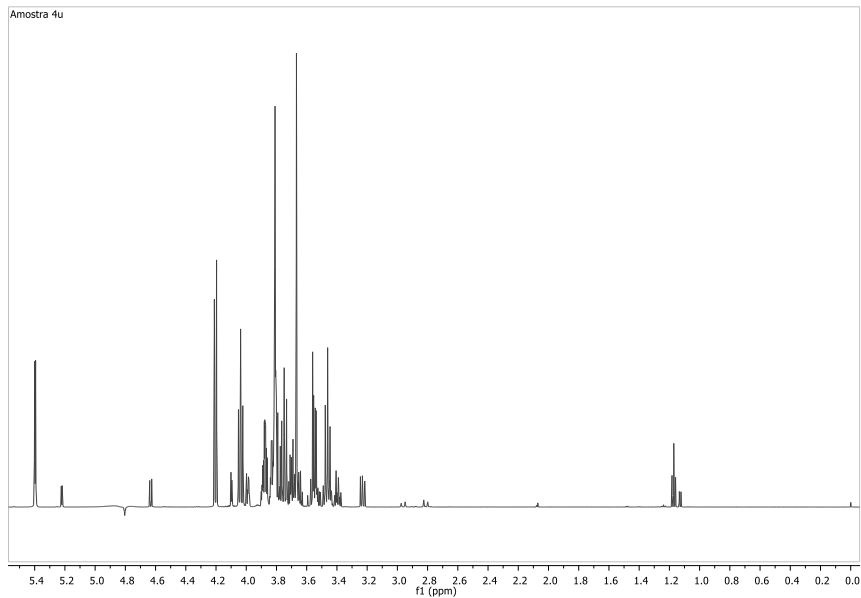


Figura D8 – Amostra 4u (Bebida de fruta adoçada sabor uva - Kapo)



ANEXO E – Tabela de Quantificação da Amostra 2m

	Etanol (mg/mL)	Frutose (mg/mL)	α -glicose (mg/mL)	β -glicose (mg/mL)	Sacarose (mg/mL)	Açúcares totais (mg/ml)
1ª replicata	0,02	25,46	13,20	23,90	5,67	68,23
2ª replicata	0,02	25,51	13,08	23,98	5,62	68,19
3ª replicata	0,02	25,90	13,25	24,26	5,70	69,11
Média	0,02	25,62	13,18	24,05	5,67	68,51
Desvio Padrão	0,0003	0,245	0,086	0,191	0,041	0,525
Coefficiente de variação	1,78	0,96	0,65	0,79	0,72	0,77

ANEXO F – Tabela de Quantificação da Amostras de Estabilidade 2m'

	Etanol (mg/mL)	Frutose (mg/mL)	α -glicose (mg/mL)	β -glicose (mg/mL)	Sacarose (mg/mL)	Açúcares totais (mg/mL)
1ª replicata	0,20	24,64	11,56	22,33	4,57	63,11
2ª replicata	0,21	24,72	11,65	22,12	4,78	63,27
3ª replicata	0,22	24,36	11,44	22,08	4,55	62,42
Média	0,21	24,57	11,55	22,18	4,63	62,93
Desvio Padrão	0,014	0,191	0,105	0,137	0,127	0,451
Coefficiente de variação	6,51	0,78	0,91	0,62	2,74	0,72

ANEXO G – Tabela de índice de refração obtidos na refratometria

Tabela G1 – Índice de refração sem correção de temperatura

Replicatas	Índice de refração						
	Amostras						
	3m	4m	5m	1u	2u	3u	4u
1ª	1,3475	1,3460	1,3455	1,3550	1,3540	1,3530	1,3450
2ª	1,3480	1,3460	1,3455	1,3555	1,3535	1,3525	1,3450
3ª	1,3490	1,3565	1,3455	1,3555	1,3535	1,3520	1,3455

Tabela G2 – Índice de refração com correção da temperatura

Replicatas	Índice de refração						
	Amostras						
	3m	4m	5m	1u	2u	3u	4u
1^a	1,3478	1,3463	1,3459	1,3553	1,3544	1,3534	1,3454
2^a	1,3483	1,3463	1,3459	1,3558	1,3539	1,3528	1,3454
3^a	1,3493	1,3469	1,3459	1,3558	1,3539	1,3523	1,3459

Tabela G3 – Índice de refração convertido em mg/mL de sacarose

Replicata	Quantidade de sacarose (mg/mL)						
	Amostras						
	3m	4m	5m	1u	2u	3u	4u
1^a	103,77	86,51	89,75	156,49	149,78	143,07	86,51
2^a	106,88	92,98	89,75	159,85	146,43	138,64	86,51
3^a	114,55	97,30	89,75	159,43	146,43	135,40	89,75
Média	108,40	94,42	89,75	158,73	147,55	139,04	87,59
Desvio padrão	5,55	2,49	0,00	1,94	1,94	3,85	1,87
Coefficiente de variação	5,12%	2,64%	0%	1,22%	1,31%	2,77%	2,13%