

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo da Origem Biossintética do Ácido Acético
e Determinação da Acidez em amostras de Vinagres
Comerciais Via RMN de ^2H e ^1H**

ELISANGELA FABIANA BOFFO*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração:
QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

* Bolsista CAPES

São Carlos – SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B673eo

Boffo, Elisangela Fabiana.

Estudo da origem biossintética do ácido acético e determinação da acidez em amostras de vinagres comerciais via RMN de ^2H e ^1H / Elisangela Fabiana Boffo. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
68 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Química quantitativa. 2. Ressonância magnética nuclear. 3. Vinagre. 4. SNIF – NMR. I. Título.

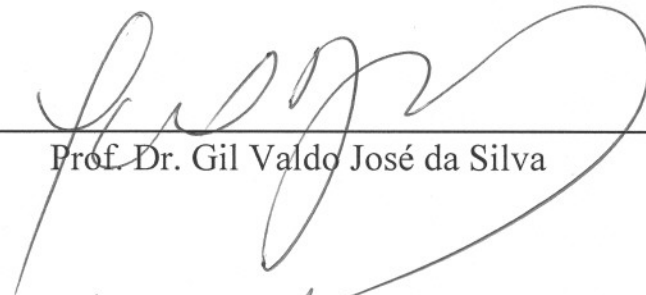
CDD: 547.35 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

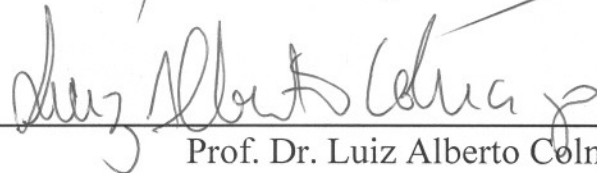
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o
exame de dissertação de mestrado da candidata **Elisangela Fabiana Boffo**
realizado em 27 de fevereiro de 2004:*



Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



Prof. Dr. Gil Valdo José da Silva



Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago

À minha família...
que muito incentivou a minha formação, estando sempre
presente, mesmo que distante, com amor e dedicação.

Ao Marcelo...
pelo amor sincero.

E especialmente à Camilly...

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Antonio Gilberto Ferreira pela oportunidade, orientação e pelos conhecimentos transmitidos durante todo o trabalho.

Aos companheiros de laboratório: Andersson, Angela, Cristina, Glaucia, Leila, Luciana, Lucinéia, Mário e Ricardo por toda a ajuda que me ofereceram, principalmente na implementação da seqüência de pulsos zgdc e na redação dessa dissertação, mas também pela amizade, descontração e troca de experiências que acontece dentro do laboratório de RMN.

Aos técnicos do Departamento de Química: Antonio, Paulo e Ricardo pelo apoio sempre presente.

Ao Professor Doutor Timothy Brocksom por ter cedido um espaço em seu laboratório, onde realizei as extrações do ácido acético presente nas amostras de vinagre.

Às alunas Olga e Fernanda pelo auxílio nas extrações e pela agradável convivência.

A todos os amigos do Departamento de Química pelas horas de estudo em conjunto e também pelos momentos de descontração.

Aos professores do Departamento de Química pela transmissão dos conhecimentos.

Aos meus pais, Antonio e Nercilha Boffo, pela compreensão e apoio para a realização de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus irmãos, Denilson e Elaine Boffo, e ao meu cunhado, Valdecir Arantes, por serem tão companheiros e confiantes...

Ao Marcelo, pelo entendimento e incentivo sempre de forma carinhosa e com muita calma, e pelo amor verdadeiro.

Aos meus amigos de Bragantina e Toledo, por não terem se esquecido de mim...

À CAPES pelo apoio financeiro.

A Deus, pelo Dom da vida, fonte de luz e inspiração, que me fortalece a cada início de um novo dia.

Resumo

ESTUDO DA ORIGEM BIOSINTÉTICA DO ÁCIDO ACÉTICO E DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ EM AMOSTRAS DE VINAGRES COMERCIAIS VIA RMN DE ^2H E ^1H

No presente trabalho descrevemos o uso da RMN no estudo da origem biossintética do ácido acético e na determinação da acidez em amostras de vinagres comerciais. A razão isotópica natural de hidrogênio foi estudada utilizando a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^2H e ^1H (SNIF-NMR – *Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance*). Essa técnica está baseada na relação do conteúdo isotópico entre ^2H e ^1H , em partes por milhão - ppm, em uma posição específica, sítio da metila, na molécula de ácido acético. O etanol que o origina é obtido a partir dos açúcares de diferentes plantas seguindo os mecanismos biossintéticos C_3 , C_4 ou CAM e resultando, portanto, em diferentes razões isotópicas. Nesse estudo verificamos a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ de vinagres obtidos de plantas C_3 , 98,6 - 111,8 ppm, C_4 , próximos a 130 ppm, e CAM, 106,0 ppm, bem como dos *agrins*, que são vinagres obtidos a partir de uma mistura de álcoois produzidos pela fermentação de açúcares de cana-de-açúcar e uva, e encontramos um valor de 115,2 – 129,3 ppm. A análise dos *agrins* mostrou que existem diferentes proporções do ácido acético oriundo da cana-de-açúcar e da videira. Para o ácido acético sintético foi obtido um valor superior aos anteriores, 153,5 ppm. As amostras comerciais foram coletadas no comércio de São Carlos – SP e os padrões foram obtidos de fontes confiáveis e forneceram valores da relação isotópica que foram tomados como referência. A acidez das amostras foi estudada via RMN de ^1H e por titulação. Os valores encontrados por essas técnicas indicaram que a acidez dos vinagres está entre 1 e 7%, sendo que as amostras comerciais apresentaram valores próximos a 4%, concordando com os valores informados nos rótulos dos produtos.

Abstract

BIOSYNTHETIC ORIGIN STUDY OF ACETIC ACID AND ACIDITY DETERMINATION IN COMMERCIAL VINEGAR SAMPLES THROUGH ^2H AND ^1H NMR

In this work we describe the use of NMR in the biosynthetic origin study of acetic acid and acidity determination in commercial vinegar samples. The site-specific natural isotope fractionation of hydrogen and deuterium was investigated by ^2H and ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (SNIF-NMR). This method is based on the ratio of deuterium/hydrogen content at a specific position (methyl site) of acetic acid molecule. The acetic acid, after ethanol fermentation, can be obtained from plants sugars with different biosynthetic mechanisms C_3 , C_4 or CAM and resulting in different isotopic ratios. In this study we measured the isotopic ratio of vinegars obtained from C_3 plants 98,6 –111,8 ppm, C_4 plants about 130 ppm, and CAM plants 106,0 ppm. We also measured content of *agrins*, which are vinegars of alcohol and wine, 115,2 – 129,3 ppm, and for the synthetic acetic acid with higher value, 153,5 ppm. Commercial samples were obtained in the local shopping in São Carlos – SP and the standard samples were obtained from reliable origin and provided isotopic ratio values used as reference. Sample acidity was studied through ^1H NMR and by titration. These techniques provided acidity between 1 and 7%. Commercial samples showed acidity about 4% that agree with the values in product labels instruction.

Lista de Abreviaturas

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
δ	Deslocamento químico
AQ	Tempo de aquisição
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
B_0	Campo magnético estático de um espectrômetro de RMN
B_1	Campo oscilatório de radiofrequências
CAM	Metabolismo do ácido crassuláceo (<i>Crassulacean Acid Metabolism</i>)
C_3	Termo aplicado para denotar a rota metabólica seguida pela maioria das plantas para assimilação do CO_2 durante a fotossíntese (ciclo de Calvin)
C_4	Termo aplicado para denotar a rota metabólica seguida, principalmente, pelas gramíneas tropicais para assimilação do CO_2 durante a fotossíntese (ciclo de Hatch-Slack)
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
d1	Tempo de espera entre as aquisições
EM	Espectrometria de Massas
IRMS	<i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>
FID	Decaimento da indução livre (<i>Free Induction Decay</i>)
$(^2H/^1H)_I$	Número de átomos de deutério em relação ao número de átomos de hidrogênio no sítio da metila do etanol
$(^2H/^1H)_{II}$	Número de átomos de deutério em relação ao número de átomos de hidrogênio no sítio do metileno do etanol
$(^2H/^1H)_{III}$	Número de átomos de deutério em relação ao número de átomos de hidrogênio no sítio da hidroxila do etanol
LB	Multiplicação exponencial aplicada no FID para que seja aumentada

	a relação sinal/ruído do espectro (<i>Line Broadening</i>)
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
P1	Duração do pulso de 90° com alta potência
PL9	Atenuação do pulso de pré-saturação
PGA	Ácido fosfoglicérico (<i>3-phosphoglyceric acid</i>)
RuBP	Ribulose 1,5-bifosfato
<i>rf</i>	Radiofrequência
RG	Ganho do receptor (<i>Receiver Gain</i>)
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1
RMN de ² H	Ressonância Magnética Nuclear de deutério
SI	Número de pontos utilizados no processamento do espectro
SNIF-NMR	<i>Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance</i>
SW	Janela espectral utilizada nos espectros (<i>Spectral Width</i>)
T ₁	Tempo de relaxação spin – rede (longitudinal)
T ₂	Tempo de relaxação spin – spin (transversal)
TD	Número de pontos utilizados na aquisição do espectro (<i>Time Domain</i>)
TMS	Tetrametilsilano
TMU	<i>N,N</i> -Tetrametiluréia

Lista de Tabelas

TABELA 1.1 –	Valores típicos para a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	20
TABELA 3.1 –	Descrição e origem das amostras de vinagre analisadas.....	33
TABELA 3.2 –	Proporções dos vinagres de vinho e de álcool utilizados na construção da curva de calibração.....	34
TABELA 3.3 –	Descrição e origem das amostras de <i>agrin</i> analisadas.....	34
TABELA 4.1 –	Massas de ácido acético, obtidas após cada extração.....	41
TABELA 4.2 –	Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	44
TABELA 4.3 –	Valores teóricos ou da literatura da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ para os vinagres.....	46
TABELA 4.4 –	Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (curva de calibração).....	47
TABELA 4.5 –	Massas de ácido acético, obtidas após cada extração, para os <i>agrins</i>	48
TABELA 4.6 –	Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ para os <i>agrins</i>	49
TABELA 4.7 –	Porcentagens do ácido acético de vinho e álcool nos <i>agrins</i> e seus valores no mercado.....	50
TABELA 4.8 –	Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da acidez dos vinagres analisados.....	54
TABELA 4.9 –	Volumes de NaOH utilizados para titular o $\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$	57
TABELA 4.10 –	Volume de NaOH utilizado para titular 5 mL de vinagre e a acidez calculada.....	58
TABELA 4.11 –	Valores para comparação da acidez dos vinagres.....	59
TABELA 4.12 –	Massas de ácido acético, obtidas após as extrações, para o teste da repetibilidade.....	60
TABELA 4.13 –	Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$, para o teste da repetibilidade.....	61
TABELA 4.14 –	Massas de ácido acético, obtidas após as extrações, para o teste da reprodutibilidade.....	61
TABELA 4.15 –	Valores médios da massa de ácido acético no tubo e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$, para o teste da reprodutibilidade.....	62

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 –	Esquema reacional da primeira etapa da fermentação.....	2
FIGURA 1.2 –	Esquema reacional da segunda etapa da fermentação.....	2
FIGURA 1.3 –	Representação esquemática do Ciclo de Calvin.....	7
FIGURA 1.4 –	Representação esquemática do Ciclo C ₄	9
Figura 1.5 –	Representação esquemática do Ciclo CAM.....	10
FIGURA 1.6 –	Esquema da seqüência de pulsos zgdc (nomenclatura utilizada em equipamentos Bruker).....	16
FIGURA 1.7 –	Esquema da seqüência de pulsos zgpr (nomenclatura utilizada em equipamentos Bruker).....	24
FIGURA 1.8 –	Esquema da seqüência de pulsos zgcpr (nomenclatura utilizada em equipamentos Bruker).....	25
FIGURA 3.1 –	Ilustração de um extrator contínuo líquido/líquido.....	30
FIGURA 4.1 –	Espectro de RMN de ¹ H de um vinagre comercial de maçã, utilizando o padrão DMF e a seqüência de pulsos zgcpr.....	39
FIGURA 4.2 –	Espectro de RMN de ¹ H de um vinagre comercial de maçã, utilizando o padrão TMU e a seqüência de pulsos zgcpr.....	39
FIGURA 4.3	Espectro de RMN de ¹ H de um vinagre comercial de maçã, utilizando a seqüência de pulsos zg.....	40
FIGURA 4.4 –	Espectro de RMN de ¹ H de um vinagre comercial de vinho, utilizando o padrão TMU e a seqüência de pulsos zg.....	42
FIGURA 4.5 –	Espectro de RMN de ² H de um vinagre comercial de vinho, utilizando o padrão TMU e a seqüência de pulsos zgdc.....	43
FIGURA 4.6 –	Curva de calibração.....	47
FIGURA 4.7 –	Espectro de RMN de ¹ H de um vinagre comercial de vinho branco, utilizando a seqüência de pulsos zg.....	51
FIGURA 4.8 –	Espectro de RMN de ¹ H de um vinagre comercial de vinho branco, utilizando a seqüência de pulsos zgpr.....	52
FIGURA 4.9–	Espectro de RMN de ¹ H de um vinagre comercial de vinho branco, utilizando a seqüência de pulsos zgcpr.....	52
FIGURA 4.10 –	Espectro de RMN de ¹ H de um vinagre comercial de vinho tinto, utilizando a seqüência zgcpr.....	53

- FIGURA 4.11 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre artesanal de maçã, utilizando a seqüência zgcppr..... 55
- FIGURA 4.12 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de maçã, utilizando a seqüência zgcppr..... 56

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O Vinagre	1
1.1.1 A História do Vinagre.....	3
1.1.2 Os Tipos de Vinagres	3
1.2 Os Mecanismos Biossintéticos.....	4
1.2.1 A Fixação do Carbono em Plantas C ₃	5
1.2.2 A Fixação do Carbono em Plantas C ₄	8
1.2.3 A Fixação do Carbono em Plantas CAM	9
1.3 RMN – Ressonância Magnética Nuclear.....	11
1.3.1 SNIF-NMR – <i>Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance</i>	12
1.3.1.1 A determinação das Razões Isotópicas no Sítio Específico.....	13
a) O Padrão Interno.....	15
1.3.1.2 RMN de ² H para Determinações Quantitativas da Razão Isotópica	15
a) A aquisição dos dados sem <i>Lock</i>	17
1.3.1.3 A Autenticação de Vinhos	18
1.3.1.4 A Autenticação de Sucos de Frutas	19
1.3.1.5 A Autenticação de Outros Produtos Ricos em Açúcar	20
1.3.1.6 O Ácido Acético como um Parâmetro Isotópico	21
1.3.2 Supressão do Sinal do Solvente	22
1.3.2.1 Seqüência de pulsos zgpr	23
1.3.2.2 Seqüência de pulsos zgcppr.....	24
1.3.3 Determinação da Acidez do Vinagre	25
1.3.3.1 Via RMN de ¹ H	25
1.3.3.2 Titulação ácido-base	27
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 SNIF-NMR.....	29
3.1.1 O Padrão Interno.....	29
3.1.2 A Extração do Ácido Acético	30

3.1.3 Os espectros de RMN de ^1H	31
3.1.4 Os espectros de RMN de ^2H	31
3.1.5 O Cálculo da Relação Isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$	31
3.1.6 As Amostras Analisadas.....	32
3.1.6.1 Os <i>Agrins</i>	33
3.2 Supressão do Sinal da Água	34
3.3 Determinação da Acidez do Vinagre	35
3.3.1. Via RMN de ^1H	35
3.3.2 Via Titulação.....	36
3.4 Teste de Exatidão	36
3.5 Teste de Precisão.....	36
3.5.1 SNIF-NMR.....	36
3.5.1 Determinação da Acidez do Vinagre	37
4. <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	38
4.1 SNIF-NMR	38
4.1.1 O Padrão Interno.....	38
4.1.2 A Extração do Ácido Acético	40
4.1.3 Os espectros de RMN de ^1H	41
4.1.4 Os espectros de RMN de ^2H	42
4.1.5 O Cálculo da Relação Isotópica	43
4.1.5.1 Os <i>Agrins</i>	47
4.2 Supressão do Sinal da Água	50
4.3 Determinação da Acidez do Vinagre	53
4.3.1 Via RMN de ^1H	53
4.3.2 Via Titulação.....	56
4.4 Teste de Exatidão	59
4.5 Teste de Precisão.....	60
4.5.1 SNIF-NMR.....	60
4.5.1 Determinação da Acidez do Vinagre	62
5. <i>CONCLUSÕES</i>	63
6. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Vinagre

Produto oriundo da fermentação de bebidas alcoólicas, o vinagre tem como principal característica, para seus apreciadores, o sabor. Dentre os tipos de vinagre mais conhecidos e utilizados no Brasil estão os de vinho, tanto tinto como branco, de álcool e de maçã.

O alto consumo de vinagre em nosso país deve-se ao fato do Brasil ser um país tropical, onde o consumo de salada é incentivado pelo calor, e a conseqüente necessidade de uma alimentação mais leve, mais saudável, estimulando o cuidado com a saúde. O vinagre pode ser usado no tempero de saladas, mas também na limpeza dos legumes e verduras¹, mostrando a sua ação bactericida.

Os adeptos da medicina natural recomendam certos tipos de vinagres, como o de maçã, para o tratamento de artrite, indigestão, osteoporose, cânceres e outras enfermidades, além do combate ao envelhecimento. Essas alegações ainda não foram comprovadas cientificamente, mas alguns pacientes que sofrem de artrite afirmam que um tônico elaborado a partir do vinagre de maçã e de mel auxilia no alívio das dores nas articulações².

Levando-se em conta que o ácido acético contido no vinagre é obtido pela oxidação do etanol, todas as matérias-primas alcoólicas e as que contenham carboidratos, passíveis de sofrerem fermentação alcoólica, podem ser utilizadas na produção de vinagre. Aquelas chamadas de *amiláceas* contêm amido como carboidrato e necessitam previamente às fermentações, da sacarificação do amido, que é feita com amilases do malte. Podemos citar como exemplos, batata, batata doce, mandioca, arroz, milho, trigo, cevada e centeio. As *açucaradas*, são as que contêm carboidratos onde a fermentação alcoólica pode acontecer diretamente, das

quais podemos destacar: uva, maçã, caqui, abacaxi, laranja, mel, melado, açúcar mascavo, malte e xarope de glucose³.

Para obtenção do vinagre a partir das matérias-primas originais, são necessários dois processos de fermentação distintos: alcoólica e acética. A fermentação alcoólica é feita por leveduras, tais como a *Saccharomyces cerevisiae* e acontece em um processo anaeróbico cuja equação simplificada³ está representada na figura 1.1.

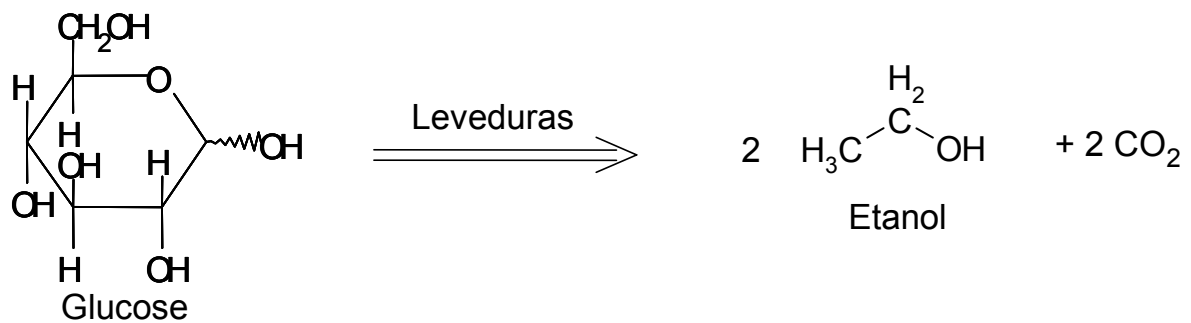


FIGURA 1.1 – Esquema reacional da primeira etapa da fermentação (alcoólica).

Além do etanol e do dióxido de carbono ainda existem os produtos secundários da fermentação como glicerol, ácido succínico, etc.

Na fermentação acética, ou seja, a 2ª etapa, o etanol é oxidado a ácido acético e essa reação é feita por bactérias acéticas e em meio aeróbico. As principais espécies utilizadas do gênero *Acetobacter* são: *A. aceti orleanensis*, *A. aceti xilinum*, e *A. aceti liquefaciens*. A reação³ pode ser resumida na figura 1.2.

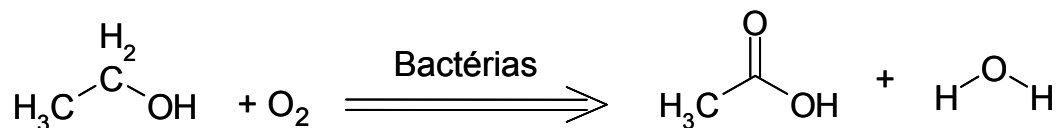


FIGURA 1.2 – Esquema reacional da segunda etapa da fermentação (acética).

Além do ácido acético são produzidas pequenas quantidades de outros produtos como aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos, sendo o acetaldeído o composto secundário predominante, e que tem o inconveniente de provocar “aspereza” ao vinagre.

Normalmente os vinagres possuem entre 4 e 14% de ácido acético⁴, sendo designado de vinagre duplo o fermentado acético que apresentar entre 8 e 11,9 % de ácido e triplo aquele que apresentar uma quantidade superior a 12 % de ácido.

1.1.1 A História do Vinagre

A origem do termo vinagre foi a palavra francesa *vinaigre*, que significa vinho ácido. Conta-se que na antiguidade um chefe de família preparou um suco fresco, levemente adocicado, como era de costume na época, e o colocou em uma jarra de pedra. Passando-se algum tempo, esse suco deveria fermentar e dar origem a um líquido ligeiramente inebriante, que é o vinho. Todavia, esse líquido, provavelmente, ficou durante muito tempo dentro da jarra, acabando por se transformar em uma bebida ácida, diferente do vinho conhecido. Nesse momento surgiram dúvidas entre as pessoas a respeito de que tipo de bebida seria aquela e eles imaginavam que algum tipo de transformação havia acontecido, mas não sabiam explicar o fato⁵. O que realmente aconteceu ninguém sabia, mas o importante é que o vinagre havia entrado na história da humanidade.

Muitos mitos e práticas foram utilizados durante séculos na tentativa de preparar o vinagre, especialmente quando as pessoas passaram a acreditar que ele promovia muitas curas, tais como, a perda de peso, diminuição do colesterol, retardamento do envelhecimento, combate à artrite, reumatismo e osteoporose, entre outras⁶. Atualmente sabemos que a complicada arte de fazer vinagre era desnecessária e que o sucesso das receitas primitivas estava na contaminação acidental do vinho por microorganismos necessários à sua fermentação, ou seja, o que originou o vinagre foi sua exposição ao ar.

1.1.2 Os tipos de Vinagres

Vários tipos de vinagres têm sido produzidos atualmente, em maior ou em menor escala, e alguns deles estão listados abaixo. Os mais comercializados no Brasil são os de vinho, álcool e maçã.

Vinagre balsâmico: É um vinagre escuro e levemente aromatizado, que geralmente é produzido com uvas selecionadas da região de Modena, na Itália.

O autêntico vinagre balsâmico passa por um processo de fermentação longo, feito em barris de madeira, que deve durar pelo menos dez anos, por isso seu valor é tão superior aos demais vinagres⁷.

Vinagre de maçã: Esse vinagre é obtido a partir do suco de maçã fermentado. A medicina popular diz que é o mais saudável dos vinagres, pois é rico em sais minerais, fósforo, potássio, cloro, sódio, entre outros⁶.

Vinagre de vinho: É o vinagre mais comum no Brasil e é elaborado a partir do vinho tinto ou branco. Sua qualidade difere de uma marca para outra e alguns podem ser mais ácidos⁷.

Vinagre de álcool: É o vinagre preparado a partir da cana-de-açúcar. Sua maior utilização é em conservas⁷.

Além desses tipos de vinagres existem outros que são comercializados em pequena escala ou que começaram a ser industrializados há pouco tempo. São eles: **vinagre de malte**⁷ (produto escuro e fermentado, feito a partir do malte da cevada), **de arroz**⁷ (utilizado na culinária japonesa, é obtido a partir da fermentação do arroz, sendo mais suave e ligeiramente adocicado), **de mel**⁸ (feito a partir do mel puro, que é uma matéria-prima de alto valor biológico, por isso seu valor é maior que os outros vinagres), **de abacaxi** e **de laranja**.

Os **vinagres aromatizados** são aqueles que contêm dentro de seus frascos ervas, frutas ou alho⁷.

Ainda existem alguns tipos de vinagre que são chamados de *agrin* ou fermentado acético de álcool e vinho, tanto branco como tinto. A acidez deles é descrita no frasco como sendo igual a 4%, mas as porcentagens do ácido acético vindo do álcool e do vinho não são informadas.

1.2 Os Mecanismos Biossintéticos

As características das plantas superiores com relação ao seu modelo de assimilação do CO₂ têm levado a sua classificação dentro de três grupos distintos: plantas C₃, C₄ e CAM⁹. Os dois primeiros grupos são assim nomeados com base em estudos feitos expondo-se as plantas ao dióxido de carbono radioativo. Conseqüentemente acontece uma reação entre o açúcar da planta e o CO₂ radioativo, formando compostos de três ou quatro átomos de carbono marcados

isotopicamente, dando o nome aos grupos. O terceiro grupo refere-se às plantas que realizam o metabolismo do ácido crassuláceo (*Crassulacean Acid Metabolism* – CAM), cujo nome se deve ao fato de ter sido primeiro encontrado nas plantas da família Crassulaceae.

Nas plantas C₃ o primeiro produto estável formado é o ácido fosfoglicérico (*3-phosphoglyceric acid* – PGA)¹⁰, enquanto que nas plantas C₄ o primeiro produto formado é o ácido oxalacético. No entanto, a velocidade do metabolismo desse intermediário inicial é tão rápida que os primeiros produtos majoritários que podem ser detectados são o ácido málico e o ácido aspártico. As plantas CAM também produzem grandes quantidades de ácidos orgânicos com quatro átomos de carbono, que são os primeiros produtos da assimilação do CO₂.

O ciclo C₃ foi descoberto por Calvin e é denominado Ciclo de Calvin ou Ciclo Fotossintético Redutivo do Carbono de Plantas C₃. Após os trabalhos de Calvin, outros pesquisadores, Hatch, Slack, Kortschak, determinaram que algumas espécies de gramíneas tropicais como a cana-de-açúcar e o milho, são capazes de fixar o CO₂ em compostos de quatro átomos de carbono. Essas plantas são denominadas de Plantas Concentradoras de CO₂ ou Plantas C₄. Posteriormente, foi descoberto que algumas espécies de plantas de regiões áridas, como as cactáceas, abrem seus estômatos somente à noite e fixam o CO₂ pelo mecanismo C₄. Durante o dia, essas plantas fecham os estômatos para evitar a perda excessiva de água, e apresentam mecanismo C₃, as plantas com essas características são denominadas de plantas CAM¹¹.

1.2.1 A Fixação do Carbono em Plantas C₃

A fixação do CO₂ pode ocorrer usando o poder redutor do NADPH e a energia fornecida pelo ATP, ambos produzidos na fase fotoquímica da fotossíntese. As reações enzimáticas envolvidas no processo de fixação e redução do carbono nos carboidratos foram estudadas primeiramente por Melvin Calvin e colaboradores, usando técnicas radioisotópicas (¹⁴C) e cromatografia bidimensional de papel. Pelo seu trabalho na elucidação do processo de fixação do carbono na fotossíntese, Calvin recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1961¹¹.

Os trabalhos de Calvin foram realizados com as algas verdes unicelulares *Chlorella* e *Scenedesmus*, em virtude de sua similaridade bioquímica

com as plantas superiores e também pelo fato de poderem ser cultivadas sob condições uniformes e serem mortas rapidamente após ensaios de curta duração a que eram submetidas.

Nas plantas C_3 , a fixação do carbono nos açúcares pode ser considerada como ocorrendo em quatro fases distintas^{9, 11}:

- a) Fase de carboxilação, catalisada pela enzima *Rubisco*;
- b) Fase de redução, onde se utilizam o NADPH e o ATP;
- c) Fase de regeneração do aceptor de CO_2 e
- d) Fase de síntese de produtos.

a) Fase de Carboxilação

Essa é uma fase enzimática, que consiste de uma reação de adição do CO_2 a um açúcar de cinco átomos de carbono, a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP), seguida de uma clivagem molecular, para formar duas moléculas de ácido fosfoglicérico (PGA) de três carbonos. Essa reação é catalisada pela enzima *ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco)*.

A enzima *Rubisco* além de atuar como uma carboxilase, ela também apresenta atividade oxigenase. Quando atua como oxigenase, o aceptor inicial de CO_2 , a ribulose-1,5-bifosfato, se combina com o oxigênio para produzir uma molécula de PGA e uma do ácido fosfoglicólico (dois átomos de carbono). Esse processo é denominado de fotorrespiração.

b) Fase de Redução

Nessa fase o PGA formado pela adição de CO_2 a ribulose-1,5-bifosfato é reduzido ao açúcar de três carbonos, triose-fosfato (gliceraldeído-fosfato). A reação se dá em duas etapas, a primeira é uma fosforilação do PGA, que acontece adicionando-se um fosfato do ATP, e a segunda é uma redução do ácido difosfoglicérico, utilizando o NADPH. O NADPH é usado para transformar o grupo ácido do PGA no grupo aldeído da triose-fosfato, e o ATP é necessário para fornecer energia extra a fim de executar essa etapa. Uma vez que o CO_2 foi reduzido a um açúcar de três carbonos, a parte conservadora de energia da fotossíntese foi executada. Depois disso, é necessário regenerar a molécula aceptor inicial de CO_2 para que ocorra a fixação de CO_2 indefinidamente (fase de regeneração) e

transformar a triose-fosfato em açúcares mais complexos, carboidratos, gorduras, etc. (fase de síntese).

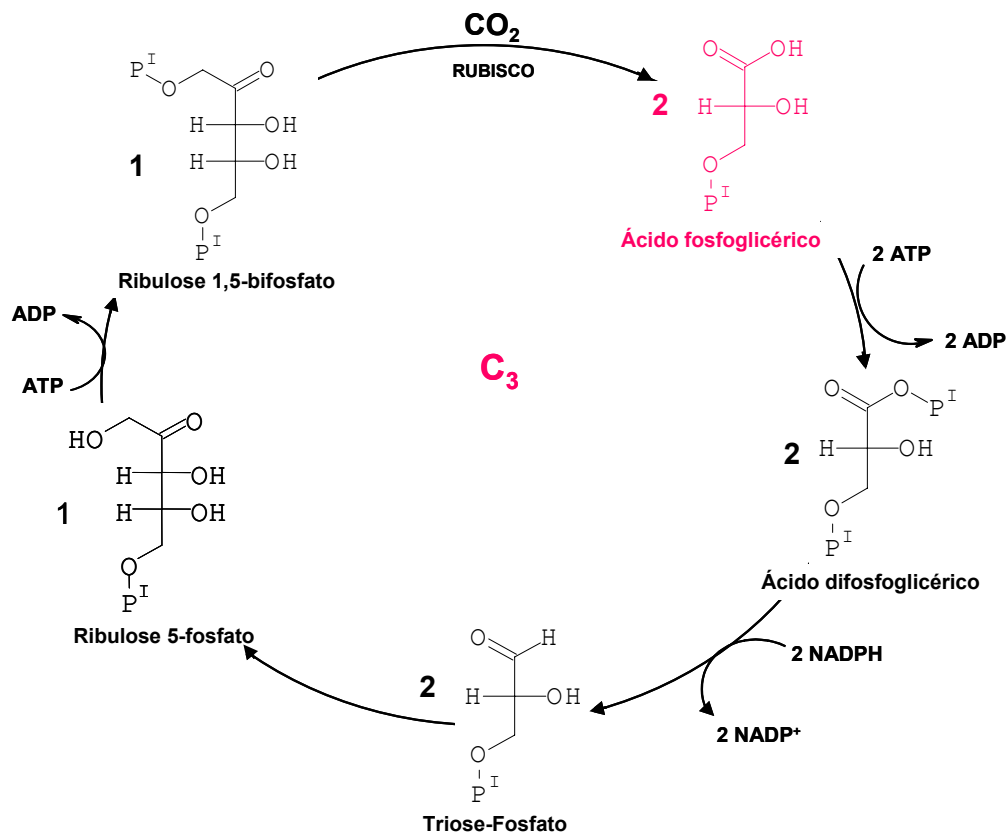
c) Fase de Regeneração

O aceptor inicial de CO_2 , RuBP, é regenerado para posteriores reações de fixação através de uma série complexa de reações envolvendo açúcares fosfatados com três, quatro, cinco, seis e sete átomos de carbono.

d) Fase de Síntese de Produtos

Os produtos finais da fotossíntese são considerados primariamente como açúcares e outros carboidratos; além de gorduras, ácidos graxos e ácidos orgânicos que têm sido também admitidos como sintetizados na fixação fotossintética do carbono.

Esse ciclo pode ser resumido esquematicamente como mostrado na figura 1.3.



Onde $\text{P}^I = \text{PO}_3^{2-}$.

FIGURA 1.3 – Representação esquemática do Ciclo de Calvin.

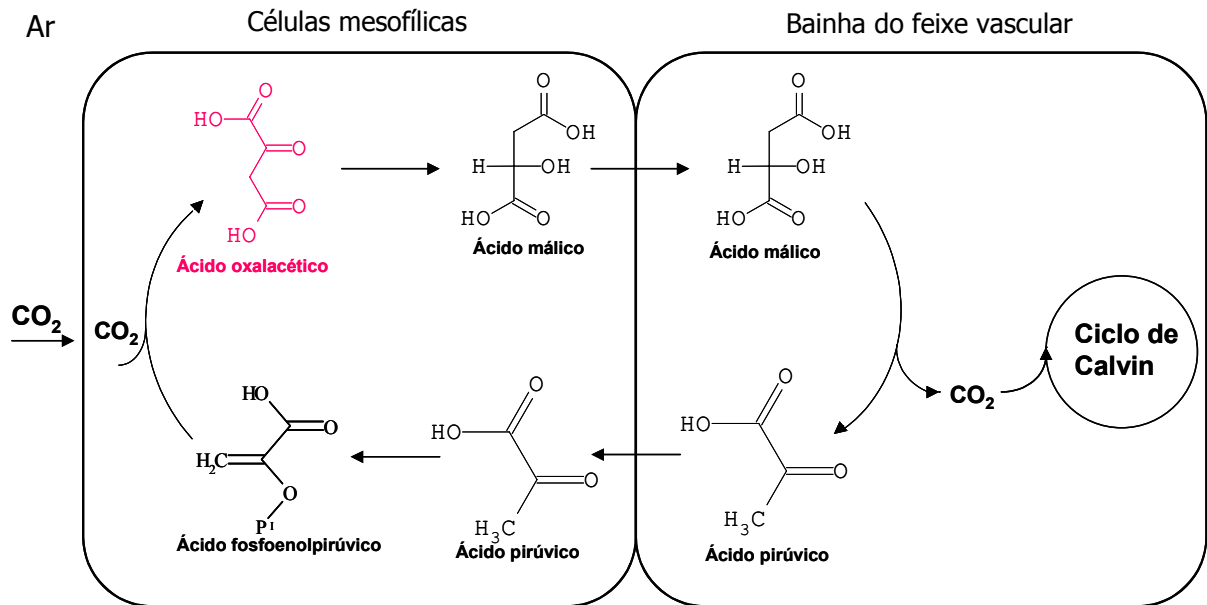
1.2.2 A Fixação do Carbono em Plantas C₄

Algumas plantas de regiões tropicais são capazes de fixar o CO₂ em compostos de quatro átomos de carbono, como os ácidos oxalacético, málico e aspártico, além da redução operada pelo ciclo de Calvin. As folhas dessas plantas apresentam uma estrutura especial denominada de “Anatomia de Kranz”, que se caracteriza por um feixe vascular bastante desenvolvido, rodeado pelas células da bainha do feixe vascular^{9, 11}. Envolvendo essas células localizam-se as células mesofílicas, com cloroplastos ganha, muito semelhantes aos cloroplastos das plantas C₃.

Nas plantas C₄, inicialmente a fixação ocorre nas células mesofílicas, onde o CO₂ é adicionado ao ácido fosfoenolpirúvico, via a enzima *fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcarboxilase)* para formar o ácido oxaloacético. Subseqüentemente, o ácido oxalacético pode ser reduzido ao ácido málico com a utilização do NADPH ou pode ser transformado no ácido aspártico, por uma reação de aminação. Posteriormente, o ácido málico é transportado até as células da bainha do feixe vascular, onde é descarboxilado liberando o CO₂ e produzindo o ácido pirúvico. O CO₂ liberado é refixado via o ciclo de Calvin e o ácido pirúvico resultante volta às células mesofílicas, onde é convertido ao ácido fosfoenolpirúvico, regenerando o acceptor inicial de CO₂.

No mecanismo de fixação de carbono dessas plantas, a alta atividade carboxilativa da enzima *PEPcarboxilase* assegura uma alta concentração de CO₂ nas células da bainha do feixe vascular, onde ocorre a refixação do CO₂ pelo ciclo de Calvin. Dessa forma, predomina-se uma alta atividade carboxilase da enzima *Rubisco* e uma menor taxa de fotorrespiração (atividade da oxigenase), porque a alta concentração de CO₂ compete melhor que o oxigênio, pela enzima e pelo substrato (RuBP). Por outro lado, ao ocorrer a fotorrespiração, o CO₂ produzido não consegue sair das folhas, sendo rapidamente refixado pela *PEPcarboxilase*.

O ciclo C₄ pode ser resumido esquematicamente como na figura 1.4.



Onde $P^i = PO_3^{2-}$.

FIGURA 1.4 – Representação esquemática do Ciclo C₄.

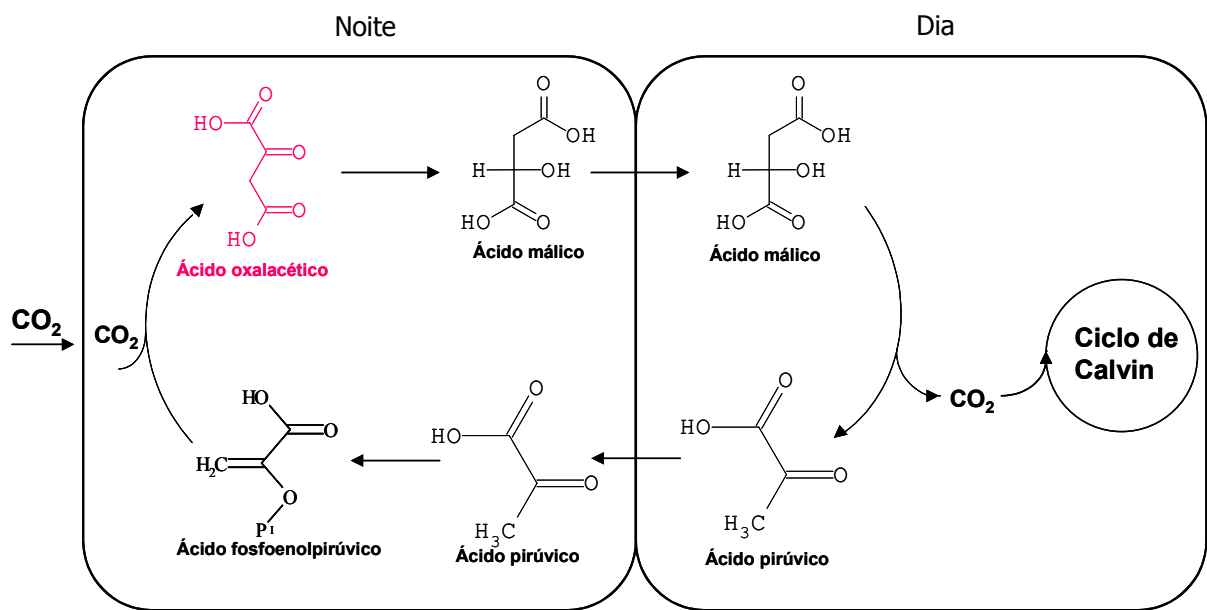
1.2.3 A Fixação do Carbono em Plantas CAM

As plantas CAM são especialmente adaptadas a regiões áridas¹², com altas temperaturas diurnas, baixas temperaturas noturnas, alta radiação e baixo teor de água no solo. Essas plantas, geralmente, abrem seus estômatos à noite e os fecham durante o dia, dessa forma minimizam a perda de água, e apresentam, portanto, alta eficiência no seu uso. Dentre as famílias de angiospermas com metabolismo CAM podemos citar Agaváceas, Bromeliáceas, Cactáceas, Crassuláceas e Orquidáceas^{11, 13}.

Embora bioquimicamente a fixação noturna das plantas CAM seja análoga àquela de plantas C₄, os conteúdos isotópicos de carbono e hidrogênio são moderados pela extensão da fixação de CO₂ durante o dia, com a carboxilação direta pela enzima *Rubisco*. Inicialmente, o CO₂ é fixado a noite, via a enzima *PEPcarboxilase*, utilizando o ácido fosfoenolpirúvico como aceptor e formando o ácido oxalacético, que em seguida é reduzido ao ácido málico, que se acumula nos vacúolos. Esse acúmulo durante a noite, é equivalente ao CO₂ fixado, e provoca a acidificação noturna da folha. No dia seguinte, com os estômatos fechados, o ácido málico é transportado para o citosol onde é descarboxilado, por ação da NAPD-

enzima málica, em ácido pirúvico e CO_2 . O CO_2 liberado internamente não sai da folha e é, então, refixado via enzima *Rubisco*.

A elevada concentração interna de CO_2 que se gera favorece a atividade carboxilativa da enzima *Rubisco* e reprime a oxigenação fotorrespiratória da RuBP. Esse ciclo pode ser resumido como mostrado na figura 1.5.



Onde $\text{P}^{\text{I}} = \text{PO}_3^{2-}$.

FIGURA 1.5 – Representação esquemática do Ciclo CAM.

As vantagens dos metabolismos CAM e C_4 sobre o C_3 são a alta taxa fotossintética (difícilmente atinge-se a saturação da fotossíntese), a ausência da fotorrespiração, a alta eficiência na utilização da água, a alta tolerância salina, e o baixo ponto de compensação para o CO_2 . As desvantagens são o alto custo energético e o conseqüente menor rendimento de fixação de CO_2 . Além disso, com exceção do abacaxi, as plantas de metabolismo CAM, ao contrário das de metabolismo C_3 , não são muito produtivas em termos de biomassa, já os vegetais de metabolismo C_4 são altamente produtivos.

1.3 RMN – Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear tem sofrido grandes avanços nos últimos tempos e além das aplicações clássicas na elucidação estrutural de compostos orgânicos, tem se mostrado uma técnica extremamente útil na análise de alimentos processados e também *in natura*¹⁴. À medida que aumentamos a resolução espectral através de campos magnéticos com maior intensidade, podemos obter em um único espectro um grande número de informações a respeito das substâncias presentes através do deslocamento químico, e da quantidade de material através da intensidade do sinal. O primeiro poderá revelar a natureza das substâncias, chegando na maioria das vezes à sua estrutura espacial, e a segunda, revelando informações a respeito da quantidade de material quando a análise é feita em condições quantitativas.

Outras técnicas como a Espectroscopia na região do Infravermelho e a Espectrometria de Massas também têm sido usadas com tal objetivo. Porém, sem dúvida alguma, a RMN é a ferramenta mais poderosa quando o alvo principal é a identificação de constituintes químicos, em quantidades apreciáveis, e com estrutura desconhecida. No entanto, devido ao grande número de informações que pode estar contido no espectro de uma única amostra, vem sendo cada vez mais utilizados programas computacionais que nos permitem distinguir com clareza as sutilezas tanto em relação à variação dos constituintes químicos como quanto à sua quantidade. Para isto faz-se uso da quimiometria, que aliada a RMN tem se mostrado uma ferramenta útil quando se pretende comparar um grande número de amostras e com pequenas variações tanto no tipo de substâncias quanto na quantidade delas presentes¹⁵.

Outro aspecto importante diz respeito ao tempo consumido no preparo da amostra a ser submetida à análise. No caso da RMN, via de regra, exige-se o mínimo dispêndio de tempo chegando na maioria das vezes a se resumir simplesmente à adição de solvente deuterado à amostra.

1.3.1 SNIF-NMR – *Site Specific Natural Isotopic Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance*

Uma das maiores contribuições da Ressonância Magnética Nuclear de alta resolução para a autenticação de alimentos é o seu uso na medida do conteúdo isotópico, em abundância natural, em sítios moleculares específicos de uma dada espécie vegetal. A técnica, conhecida como SNIF-NMR, é uma marca registrada dos laboratórios EUROFINS e foi desenvolvida no início dos anos 1980 pelos professores Gérard e Maryvonne Martin na Universidade de Nantes, em Nantes, na França^{16, 17}.

Essa técnica foi desenvolvida para detectar a adição de açúcares não declarados no vinho, podendo esse processo ser chamado de enriquecimento ou chaptalização¹⁸. Esse enriquecimento acontece quando há adição de açúcar no mosto da uva antes da fermentação, com o objetivo de aumentar o teor alcoólico, e conseqüentemente o valor do vinho. Essa adição de açúcar não necessariamente se configura em fraude, uma vez que é permitida a adição de uma certa porcentagem dependendo das condições climáticas durante uma determinada safra. Por meio de análises isotópicas é possível mostrar, se houve ou não, adição de açúcares provenientes de outras fontes como: beterraba¹⁹, milho, cana-de-açúcar¹⁹, etc. durante o processo de fermentação.

A técnica SNIF-NMR também tem sido aplicada a outros produtos, além do vinho, para mostrar a adição de açúcares não declarados^{20 - 22}. Sua aplicação tem sido estudada em conjunto pelo Comitê Europeu de Normalização e pela Associação Internacional da Comunidade Analítica (AOAC *International*). Esse estudo consiste nas medidas conjuntas de RMN e EM, sendo que a primeira determina a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ e a segunda determina a relação $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ²³.

A Espectrometria de Massas de ^{13}C pode ser usada para distinguir entre as três rotas principais de metabolismos biossintéticos, C₃, C₄ e CAM, utilizadas pelas plantas para produzirem açúcar. Enquanto a EM permite a diferenciação entre os três metabolismos, a RMN quantitativa permite a discriminação da origem botânica dentro de um único metabolismo²⁴. Por exemplo, a adulteração de vinhos e sucos de frutas pode ser feita adicionando-se açúcares derivados da beterraba, essa, por sua vez, utiliza o mesmo ciclo metabólico que a videira, a laranjeira entre outros, tornando-se impossível à detecção da origem do

açúcar adicionado utilizando-se somente a Espectrometria de Massa de $^{13}\text{C}^{25}$, pois os valores da relação isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ para o etanol obtido a partir da beterraba, do vinho e do suco de frutas são muito próximos. Já a técnica de RMN pode ser utilizada não somente para detectar esse açúcar adicionado como também para quantificá-lo, pois o etanol obtido de cada um desses açúcares apresenta valores distintos para a relação $^2\text{H}/^1\text{H}$.

1.3.1.1 A determinação das Razões Isotópicas no Sítio Específico

A distribuição isotópica é definida em termos da abundância isotópica, A , ou da razão isotópica, R ¹⁶.

$$A = \frac{\textit{pesado}}{\textit{pesado} + \textit{leve}}, \quad \text{ou} \quad \text{equação 1}$$

$$R = \frac{\textit{pesado}}{\textit{leve}} \quad \text{equação 2}$$

pesado significa o isótopo mais pesado e leve o isótopo mais leve do constituinte atômico em questão.

A e R são expressos em porcentagem (%) ou em partes por milhão (ppm) dependendo da natureza do constituinte atômico que está sendo considerado.

Similarmente, uma razão isotópica em um sítio específico, R_i , pode ser definida como a razão entre os átomos pesados e leves do mesmo elemento em um sítio específico i . Por exemplo, para o deutério, a razão isotópica no sítio específico representa o número de átomos de deutério em relação ao número de hidrogênio em um sítio i , e é dada como

$$R_i = \left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}} \right)_i \quad \text{equação 3}$$

Nesse caso, o número de átomos de deutério no sítio i pode ser considerado como equivalente ao número de isotopômeros monodeuterados do tipo i – um isotopômero sendo definido como uma espécie química equivalente de diferente conteúdo isotópico.

A razão isotópica total \bar{R} é, então, uma média ponderada das razões isotópicas R_i dos seus n isotopômeros monodeuterados i

$$\bar{R} = \sum_{i=1}^n F_i R_i \quad \text{equação 4}$$

F_i e R_i podem ser expressos como

$$F_i = \frac{p_i}{\sum_{i=1}^n p_i} \quad \text{e} \quad \text{equação 5}$$

$$R_i = \frac{f_i}{F_i} \bar{R} \quad \text{equação 6}$$

F_i é a fração molar estatística correspondente a distribuição de deutério nos n isotopômeros com p_i posições equivalentes,

f_i é a fração molar experimental ou verdadeira, que pode ser obtida diretamente da intensidade do sinal correspondente no espectro de RMN de ^2H .

A razão no sítio específico R_i pode ser determinada na equação 6, desde que a razão isotópica total seja obtida nas medidas de IRMS (*Isotope Ratio Mass Spectrometry*). Esse é um **método de referência externa**²⁶.

Os experimentos de Espectrometria de Massas não são necessários quando há utilização de um padrão interno na determinação de RMN. Nesse **procedimento de referência interna**, uma extração do ácido acético do vinagre é realizada, depois disso a massa obtida é pesada, transferida a um tubo de RMN juntamente com uma quantidade pré-conhecida de padrão (*N,N*-tetrametiluréia – TMU²⁷) e após a realização das medidas, os sinais serão integrados e obtém-se a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ a partir da fórmula abaixo²⁸

$$\left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}} \right)^A = \frac{IA}{IP} * \frac{NP}{NA} * \frac{mP}{mA} * \frac{MA}{MP} \left(\frac{^2\text{H}}{^1\text{H}} \right)^P \quad \text{equação 7}$$

$(^2\text{H}/^1\text{H})^A$: Relação isotópica deutério/hidrogênio do ácido acético.

$(^2\text{H}/^1\text{H})^P$: Relação isotópica deutério/hidrogênio do padrão.

IA e IP: Área dos sinais de RMN para as metilas do ácido acético e do padrão, respectivamente.

NA e NP: Número estequiométrico de hidrogênios das metilas do ácido acético e do padrão, respectivamente.

mA e mP: Massa do ácido acético e do padrão, respectivamente.

MA e MP: Massa molar do ácido acético e do padrão respectivamente.

a) O Padrão Interno

A seleção do composto a ser utilizado como padrão intermolecular é baseada nos seguintes critérios²⁹:

- a) Ele deve ser solúvel no solvente utilizado.
- b) Deve ser quimicamente inerte ao solvente e à amostra.
- c) Não deve ter sinais que se sobreponham aos sinais da amostra.
- d) Preferencialmente, no espectro de RMN de ^1H , deve apresentar um único singleto.
- e) Deve ter uma massa molar relativamente alta.
- f) Ele deve ser facilmente removido da amostra, se necessário.

A *N,N*-tetrametiluréia (TMU) é um solvente excelente para a dissolução de substâncias orgânicas, particularmente compostos aromáticos. Semelhante a piridina é miscível em todas as proporções não somente em água, mas em todos os solventes orgânicos comuns.

1.3.1.2 RMN de ^2H para Determinações Quantitativas da Razão Isotópica

O deutério possui uma baixa abundância natural, existem aproximadamente cento e cinquenta átomos de deutério para um milhão de átomos de hidrogênio, por isso a RMN de ^2H é consideravelmente menos sensível que a RMN de ^1H ¹⁶.

A marcação isotópica com deutério tem sido utilizada para estudar os mecanismos de reações químicas, pois o deslocamento químico de deutério ($\delta ^2\text{H}$) é idêntico ao deslocamento químico do hidrogênio correspondente ($\delta ^1\text{H}$). Portanto, a investigação no espectro de RMN de ^2H de sítios especificamente marcados pode fornecer informações valiosas para auxiliar na elucidação de compostos que possuem espectros de RMN de ^1H relativamente complexos¹⁶.

Uma vantagem da técnica SNIF-NMR é a possibilidade de medir a relação $^2\text{H}/^1\text{H}$ em abundância natural sem a necessidade da marcação isotópica.

A obtenção dos espectros de deutério em condições quantitativas, que são utilizados na determinação da razão isotópica, requer cuidados especiais na aquisição e no tratamento dos dados. Um canal para o ajuste da homogeneidade do

campo de indução magnética, geralmente um *lock* de ^{19}F , é necessário para evitar os deslocamentos do campo magnético e subsequente o alargamento dos sinais. O desacoplamento de banda larga é aplicado para remover a multiplicidade dos sinais devido ao acoplamento entre o deutério e o hidrogênio (^1H), já que a probabilidade de existirem espécies bideuteradas em abundância natural é extremamente baixa e, portanto, o acoplamento $^2\text{H} - ^2\text{H}$ pode ser ignorado.

O deutério possui spin $I = 1$ e por isso tem momento quadrupolar, como todos os outros núcleos que possuem $I \geq 1$. Embora seja um núcleo com momento quadrupolar, seu valor é muito pequeno³⁰ e, portanto, seu mecanismo de relaxação freqüentemente se assemelha ao de núcleos com spin $\frac{1}{2}$ em moléculas pequenas. Isso e a baixa eficiência relativa dos mecanismos dipolares fazem com que os efeitos nucleares Overhauser possam ser ignorados quando se realizam espectros de RMN de ^2H desacoplando-se o hidrogênio, o que é particularmente vantajoso em determinações quantitativas de deutério³¹.

A figura 1.6 ilustra graficamente a seqüência de pulsos zgdc, que é utilizada para a aquisição dos espectros de ^2H .

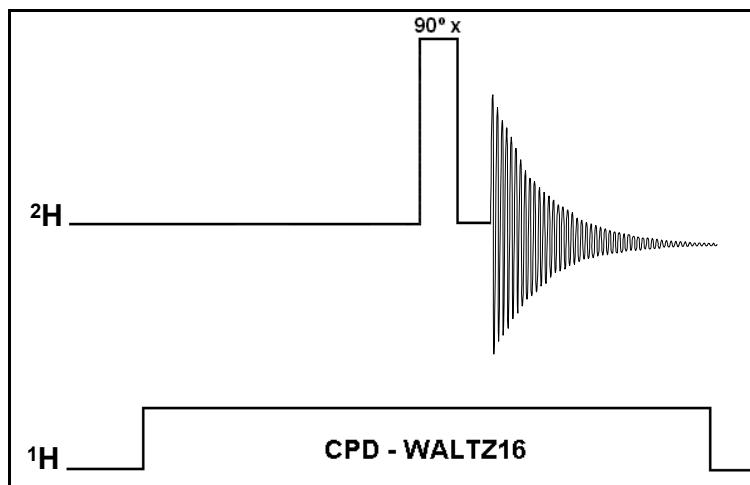


FIGURA 1.6 – Esquema da seqüência de pulsos zgdc (nomenclatura utilizada em equipamentos Bruker).

Essa seqüência utiliza-se do desacoplamento do hidrogênio durante todo o experimento, que é feito utilizando um pulso composto chamado de WALTZ-16 (*Wonderful ALternating phase Technique for Zero residual splittings*), cujo elemento básico de inversão é $90^\circ_x 180^\circ_x 270^\circ_x$ (ou mais sucintamente, $1\bar{2}3$)³².

Durante o desacoplamento de ^1H um pulso de 90°_x é aplicado na frequência do deutério, transferindo a magnetização de todos os núcleos de deutério da amostra do eixo z para o plano x-y onde é detectada, pois ali se encontra o detector do equipamento.

a) A aquisição dos dados sem *Lock*

Existem alguns casos onde o deutério não está disponível para corrigir as variações no deslocamento do campo magnético (*lock*), por exemplo, quando se deseja observar ou desacoplar esse núcleo, então, é necessário adquirir os dados sem *lock*. A realização desses experimentos é possível dentro de um intervalo de tempo limitado, que depende da velocidade de deslocamento do campo magnético (*drift*) do espectrômetro. Em experimentos que levam horas para serem realizados por causa da sensibilidade ou da pequena quantidade de amostra, a estratégia a ser aplicada é a aquisição de uma série de FIDs (*Free Induction Decays*), cada um com um período de tempo curto, por exemplo, uma hora. Os deslocamentos (*drifts*) dentro de cada grupo poderão ser ignorados, enquanto que deslocamentos que possam ocorrer fora da duração total do experimento podem ser corrigidos pela adição dos espectros no domínio da frequência, onde os deslocamentos da frequência são compensados pela utilização de uma referência interna. Essa adição fornece o aumento desejado na relação sinal/ruído³².

Uma outra alternativa na aquisição dos espectros de deutério sem o *lock* de ^{19}F é a realização de experimentos rápidos sem a utilização de solvente deuterado. Pode-se utilizar um primeiro tubo contendo a amostra e uma quantidade pequena de solvente deuterado para fazer o *shimming* (homogeneidade do campo magnético) nas mesmas condições da amostra a ser analisada. Em seguida, analisa-se a amostra de interesse rapidamente sem que haja variações no campo magnético.

1.3.1.3 A Autenticação de Vinhos

A aplicação original da técnica SNIF-NMR foi a detecção de enriquecimento em vinhos³³, sendo que as relações isotópicas medidas nos diferentes sítios moleculares do etanol presente no vinho diferiam significativamente de acordo com a origem do açúcar e da água que eram utilizados para produzi-lo. Assim, era possível dizer em que região de um país as uvas, que produziram um certo tipo de vinho, haviam sido cultivadas³⁴. Por isso, a identificação da origem geográfica, do ano de produção e da variedade é de grande interesse para os produtores e consumidores de vinho, pois fornecem critérios determinantes para garantir a qualidade do produto.

Numerosas investigações a respeito da caracterização das variedades de vinho, principalmente utilizando cromatografia líquida ou gasosa e análise sensorial foram feitas, e a técnica de enriquecimento isotópico, freqüentemente utilizada para a investigação dos mecanismos de fotossíntese³⁵, também foi aplicada. Do ponto de vista analítico, um melhor entendimento dos passos enzimáticos e dos parâmetros metodológicos que intervêm na bioconversão dos açúcares de várias origens em condições naturais pode ser obtido pelo estudo dos isótopos estáveis em abundância natural, já que eles oferecem um meio de correlação entre o material de partida e o produto final³⁶.

Valores precisos da razão isotópica podem ser encontrados pela Espectrometria de Massas, mas esse método requer a combustão da matéria orgânica em água e dióxido de carbono antes da realização do experimento e, portanto, somente a informação total é obtida. Para obter informações em posições específicas o conteúdo isotópico de ^{13}C em fragmentos moleculares tem sido investigado, porém transformações químicas cuidadosas devem ser realizadas. Devido a isso têm-se realizados estudos com outros núcleos no campo das análises isotópicas, como o deutério.

Os parâmetros isotópicos de hidrogênio no sítio específico podem atuar como fontes de significado climático. Com a utilização da técnica SNIF-NMR é possível fazer a distinção entre plantas cultivadas em países situados em diferentes latitudes do mundo ou mesmo dentro de um único país com variações climáticas, que estão, portanto, sujeitos às variações de temperatura e precipitações de chuva²⁰.

1.3.1.4 A Autenticação de Sucos de Frutas

A técnica SNIF-NMR tem sido aplicada aos sucos de frutas^{37, 38} para detectar a adição de açúcares não declarados, como o açúcar de beterraba.

A autenticidade de um suco não conhecido pode ser verificada comparando-se a razão isotópica medida com valores obtidos de produtos naturais autênticos contidos em um banco de referência¹⁶. A distribuição de deutério é influenciada por condições climáticas e geográficas, por isso, produtos autênticos do mesmo ano e região devem ser utilizados na comparação.

O princípio da técnica SNIF-NMR consiste da medida da concentração de deutério do etanol obtido após a fermentação do açúcar do suco³⁹.

O etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, possui três isotopômeros em abundância natural, que devem ser considerados. O deutério, D, portanto, pode se localizar em três posições: no sítio da metila, $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}$ (I), no sítio da metileno, CH_3CHDOH (II) ou no sítio da hidroxila, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OD}$ (III)^{16, 40}. A razão entre o deutério e o hidrogênio é a proporção de cada espécie monodeuterada em relação à molécula completamente hidrogenada, $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{I}}$, $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{II}}$ e $(^2\text{H}/^1\text{H})_{\text{III}}$. A probabilidade de se encontrar uma espécie bideuterada é muito pequena e pode ser ignorada devido à baixa abundância natural do deutério em relação ao hidrogênio⁴¹.

O etanol derivado do açúcar de beterraba é menos enriquecido em deutério no sítio I do que aquele fermentado a partir do suco de fruta, por exemplo, do suco de laranja. Já o etanol fermentado da cana-de-açúcar é mais enriquecido em deutério no sítio I que o fermentado a partir do suco de fruta⁴². Na tabela 1.1 estão as variações típicas observadas para a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ do suco de laranja, além de dois exemplos de adulteração.

TABELA 1.1 – Valores típicos para a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$.

Produto	$(^2\text{H}/^1\text{H})_I$ (ppm)		$(^2\text{H}/^1\text{H})_{II}$ (ppm)	
	Valor médio	Variações	Valor médio	Variações
Suco de laranja	104,5	> 103 (min. 103)	128	> 125
Açúcar de beterraba	92,5	92 – 93	128	> 125
Açúcar de cana/milho	110,5	110 – 111	128	> 125
Suco de Laranja + 25% de açúcar de beterraba	101,5*	–	128	–
Suco de Laranja + 25% de açúcar de cana	106,0*	–	128	–

* - Exemplos de adulteração.

Pela análise da tabela 1.1 pode-se ver que pela adição de 25% de açúcar de beterraba ao suco de laranja faz com que o conteúdo de deutério no sítio I seja consideravelmente diminuído. O mesmo raciocínio pode-se fazer para a adição de 25% de açúcar de cana, verificando-se que o conteúdo de deutério no sítio I é aumentado. Essa é uma forma de verificar se a amostra foi ou não adulterada.

A autenticação do suco de limão é feita medindo-se a distribuição natural de deutério nos ácidos cítrico e málico e nos açúcares presentes no suco, pois esses compostos podem ser produzidos por fontes mais baratas que o limão⁴³ e, em seguida, adicionados ao suco.

1.3.1.5 A Autenticação de Outros Produtos Ricos em Açúcar

Um procedimento analítico semelhante ao usado para a autenticação dos sucos de frutas é utilizado para detectar a adição de açúcares de cana ou de beterraba na produção de mel e xarope de bordo.

O mel possui conteúdo isotópico próximo ao de açúcares produzidos por plantas que realizam o metabolismo biossintético C_3 , com valores aproximadamente maiores do que o açúcar de beterraba⁴⁴. A adulteração do mel pode ser facilmente executada alimentando-se as abelhas com uma solução de sacarose, quando elas estão fazendo a coleta do néctar. A alimentação excessiva da abelha com o açúcar de beterraba causa uma diminuição no valor da relação isotópica da metila do etanol produzido a partir da fermentação do mel e a alimentação com o açúcar da cana aumenta esse valor.

O xarope de bordo é produzido da seiva xilema, *Acer saccharum*. Essa seiva é extraída no final da estação do inverno e contém aproximadamente dois por cento de sólido, que pode ser concentrado por meio da evaporação da água, obtendo-se um xarope rico em açúcar^{25, 45}. O maior componente desse xarope, a sacarose, pode ser obtido de outras fontes, muito mais baratas, por exemplo, milho, cana-de-açúcar e beterraba. Essas fontes podem ser usadas para aumentar a produção do xarope e, conseqüentemente, elevar os lucros da indústria. Esse procedimento também caracteriza uma adulteração.

1.3.1.6 O Ácido Acético como um Parâmetro Isotópico

Os vinagres são obtidos por meio de oxidações químicas ou bacteriológicas do etanol, sendo que esse é produzido pela fermentação de açúcares de várias origens, como a cana-de-açúcar, a uva, a laranja, o mel, entre outros. Por isso, a caracterização do ácido acético nos vinagres é de grande importância para a indústria de alimentos, já que visa a autenticidade das amostras produzidas em escala comercial²⁷. Porém muitos dos trabalhos publicados são baseados na Espectrometria de Massa da relação isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (IRMS). Como foi citado anteriormente, essa técnica não é totalmente eficiente quando aplicada isoladamente na detecção e quantificação de adulterantes, não conseguindo mostrar uma adulteração que foi realizada dentro de um único grupo de metabolismo biossintético, como por exemplo, um vinagre de maçã adulterado com o ácido acético proveniente de um açúcar de beterraba, isso porque ambos são obtidos pelo metabolismo C_3 . Por isso, tornou-se necessário a implementação de uma técnica que pudesse ser utilizada juntamente com a Espectrometria de Massas, ou até mesmo separadamente, com a finalidade de superar essas dificuldades. Neste sentido, iniciou-se o estudo de amostras de vinagres comerciais utilizando a técnica SNIF-NMR, visando uma perfeita caracterização dessas.

Em relação ao fracionamento isotópico de deutério, isótopo mais pesado que o hidrogênio e que pode substituí-lo nas moléculas de ácido acético, verificou-se que devido aos processos bio-enzimáticos o conteúdo de ^2H desse composto era menor do que aqueles de seus precursores glicolíticos⁴⁶. Através da técnica SNIF-NMR é possível mostrar que o etanol, obtido pela fermentação glicolítica, possui um conteúdo de deutério menor que a glucose e que a oxidação

química ou bacteriológica do etanol permite uma correlação muito próxima entre o conteúdo de deutério no grupo metila do etanol e do ácido acético³⁶.

Quando se realizam os experimentos de IRMS de ^{13}C e SNIF-NMR de ^2H em uma mesma amostra, as limitações dessas técnicas devem ser consideradas. Na medida de IRMS de ^{13}C , outras fontes de carbono além do ácido acético devem ser eliminadas da amostra, embora pequenas quantidades de água não interfiram. Já a técnica SNIF-NMR é capaz de estudar misturas de compostos impuros, apenas requerendo que o sinal sob consideração não esteja em sobreposição com aqueles da impureza, e que a massa da mistura seja conhecida.

A técnica SNIF-NMR é a mais recomendada no estudo de vinagres comerciais, pois o conteúdo de deutério no grupo metila do ácido acético é mais discriminante da origem biossintética que o conteúdo de carbono treze²⁷. No entanto, existe uma situação onde ela deve estar aliada à EM para resolver o problema de adulteração. Isso acontece quando um ácido acético sinteticamente produzido é adicionado ao ácido acético produzido pelo açúcar proveniente de plantas C_3 , levando a uma razão isotópica que não difere daquelas encontradas em vinagres naturais feitos a partir de plantas C_4 . Tal ambigüidade somente pode ser seguramente resolvida pela determinação adicional da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ⁴⁷, pois essa técnica fornecerá para a amostra analisada um valor da relação isotópica próximo ao do ácido acético sintético, e distante do ácido produzido por plantas C_3 ou C_4 .

1.3.2 Supressão do Sinal do Solvente

A supressão do sinal do solvente é necessária quando se utilizam soluções aquosas como o vinagre, no qual a quantidade de água é muito superior à das outras substâncias presentes, como o ácido acético.

Na supressão do sinal do solvente geralmente não é possível manipular esse sinal independentemente dos demais sinais no espectro⁴⁸. Por exemplo, a observação de um sinal que apresenta-se próximo ou sob o da água, ou de um núcleo que troca quimicamente com a água pode ser afetada pela supressão. Além disso, a falta de homogeneidade do campo magnético estático (B_0), do campo oscilatório de radiofrequência (B_1), e as imperfeições no pulso podem diminuir a seletividade e o grau de supressão de uma dada seqüência⁴⁹.

Para a supressão do sinal do solvente³² aplica-se uma irradiação de radiofrequência (rf) fraca e contínua na frequência do solvente, antes da excitação dos spins de todos os núcleos e aquisição dos dados, tornando os spins do solvente saturados⁵⁰ e, portanto, não observáveis. Invariavelmente, os sinais próximos à frequência do solvente também experimentam alguma perda na intensidade, pois também são afetadas pela irradiação contínua.

Um desempenho satisfatório na supressão requer uma alta homogeneidade tanto do campo magnético estático (B_0) como da frequência de B_1 . Uma homogeneidade adequada do campo B_0 (*shimming*) assegura que todos os núcleos do solvente ressoarão dentro de uma faixa de frequência pequena, pois a largura de linha do sinal medida em sua base é pequena. Uma homogeneidade satisfatória de B_1 significa que os núcleos do solvente em todas as regiões da amostra experimentarão uma potência de rf semelhante e, então, serão suprimidos igualmente³².

Para a realização da supressão do sinal dos hidrogênios da água nas amostras de vinagre testou-se duas seqüências de pulsos, que estão descritas a seguir.

1.3.2.1 Seqüência de pulsos zgpr

A seqüência de pulsos zgpr é a mais simples e mais usada na supressão do sinal do solvente. A pré-saturação é efetuada irradiando-se o sinal a ser suprimido com uma potência de rf fraca e contínua (*Continuous Wave – CW*)⁵⁰, durante um tempo longo o suficiente para eliminar as diferenças de populações entre os estados de spins α e β dos hidrogênios do solvente⁵¹, fazendo com que haja a saturação desses estados de spins. A irradiação é desligada imediatamente antes da aplicação do pulso de 90° , que é utilizado para transferir as magnetizações não saturadas para o plano x-y. A aquisição do espectro é feita após um intervalo de tempo pequeno, necessário para evitar que o sinal apresente ruídos que são oriundo do pulso de 90° .

A figura 1.7 ilustra graficamente a seqüência de pulsos zgpr.

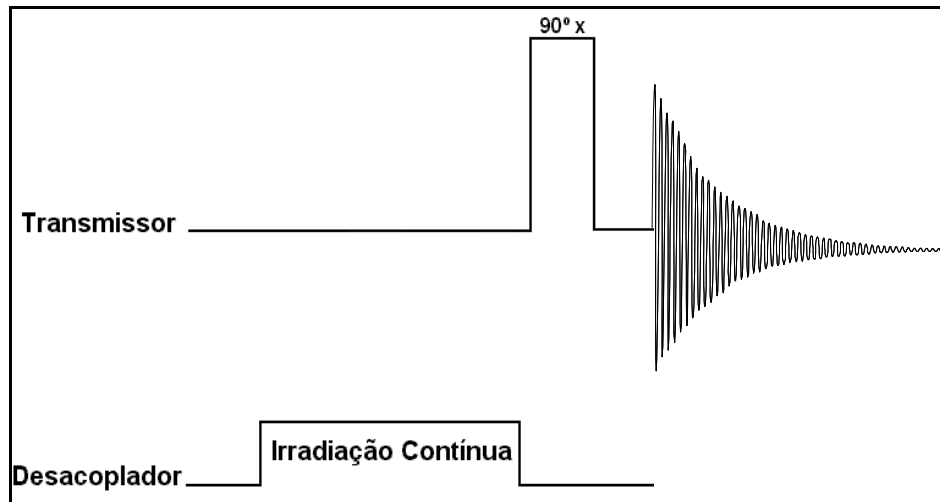


FIGURA 1.7 – Esquema da seqüência de pulsos zgpr (nomenclatura utilizada em equipamentos Bruker).

1.3.2.2 Seqüência de pulsos zgcppr

A seqüência de pulsos zgcppr utiliza um pulso composto para realizar a supressão do sinal do solvente. O pulso composto é um conjunto de pulsos com duração e fases variadas, que é usado para substituir e compensar alguns erros que são introduzidos por um pulso individual³².

Na seqüência zgcppr⁵² o pulso composto utilizado possui fases invertidas, 90°_x 90°_y 90°_{-x} 90°_{-y} , substituindo e reduzindo os erros introduzidos pelo pulso de 90°_x .

A execução da seqüência inicia-se com a aplicação de uma irradiação contínua e seletiva fixada na freqüência do sinal dos hidrogênios da água, para que seja realizada a saturação desse sinal. Em seguida é aplicado o pulso composto de 90° , que transfere a magnetização da amostra para o plano x-y onde é detectada. O pulso composto não afeta a magnetização dos hidrogênios da água, pois seus estados de spins foram saturados pela irradiação contínua. Após a aplicação do pulso composto é necessário esperar um período de tempo curto antes da aquisição do espectro, para evitar os ruídos oriundos do último pulso, como na seqüência zgpr. Na figura 1.8 está a ilustração gráfica da seqüência de pulsos zgcppr.

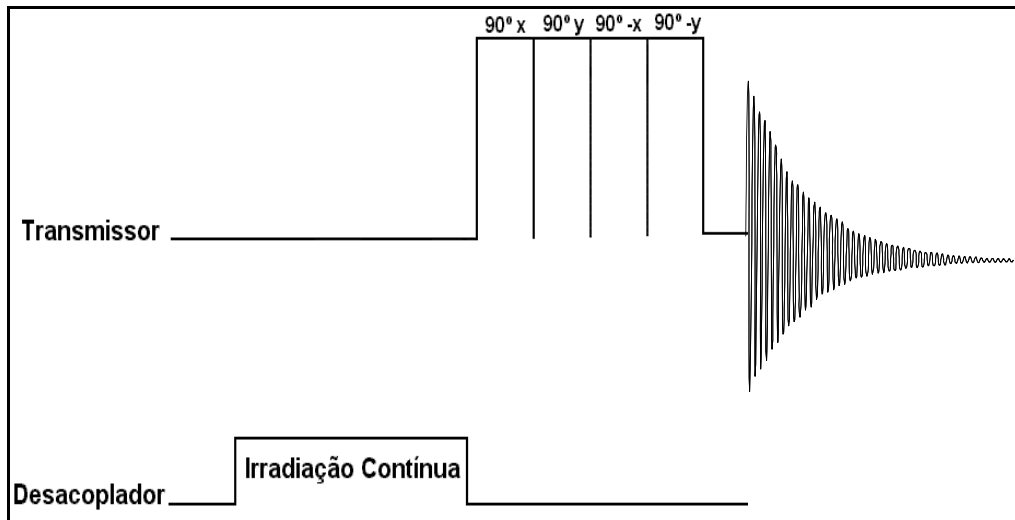


FIGURA 1.8 – Esquema da seqüência de pulsos zgcppr (nomenclatura utilizada em equipamentos Bruker).

1.3.3 Determinação da Acidez do Vinagre

1.3.3.1 Via RMN de ^1H

Embora o método mais comum e prático de quantificação por RMN seja a medida da área do sinal, existem outros métodos potencialmente úteis. O deslocamento químico, a largura e a altura do pico podem ser usados em ocasiões especiais²⁹.

O deslocamento químico pode ser usado quando as mudanças no mesmo surjam somente do parâmetro que está sendo medido. Uma relação linear entre o deslocamento químico observado e a concentração pode ser obtida se não houver mudanças significativas no grau de dissociação de cada componente com a concentração.

A suposição que se faz quando se utiliza a altura do sinal é que ele é aproximadamente um triângulo e a área, portanto, é proporcional a altura. Esse raciocínio é válido se todos os picos medidos tiverem a mesma largura e forma. Em RMN, a largura do sinal pode ser o resultado da falta de homogeneidade do campo magnético. Quando a largura é determinada por ela, a altura pode ser seguramente medida. Devido ao fato da facilidade e exatidão na medida da área pela integração, a altura é raramente usada.

A área do sinal de RMN de ^1H é proporcional ao número relativo de núcleos em uma molécula que dão origem ao sinal, por isso surgiu o uso da integração dos mesmos. Em experimentos de rotina, a integração pode fornecer uma precisão de 10 – 20 %. Esse nível de precisão pode ser suficiente para se estimar o número relativo de hidrogênios em uma molécula, mas é inadequado para uma medida quantitativa, pois essa requer uma precisão de 1 – 2 %^{29, 32}, que pode ser obtida tomando-se alguns cuidados.

Na aquisição dos dados, além da necessidade de uma relação sinal/ruído adequada no espectro, dois fatores são importantes. O primeiro deles diz respeito ao tempo de relaxação dos spins. Para obter corretamente as intensidades relativas dos sinais é necessário esperar que os spins relaxem totalmente entre a aplicação dos pulsos, requerendo-se um tempo de reciclagem de aproximadamente cinco vezes o tempo de relaxação longitudinal (T_1) do núcleo mais lento. Por isso, é importante conhecer o valor de T_1 para a amostra de interesse, sendo que esse valor pode ser estimado usando o ponto de nulo, que é baseado no método conhecido como inversão e recuperação (*Inversion Recovery*)³².

O segundo fator se refere à digitalização dos dados, de tal forma que as linhas dos sinais sejam bem definidas. Além disso, os sinais que serão integrados não podem estar sobrepostos a outros sinais e também não devem estar muito distantes para que não surjam erros de integração oriundos das deformações na linha de base.

O processamento dos dados também deve ser adequado. A multiplicação por uma função exponencial, que melhora a relação sinal/ruído, geralmente é aplicada aos espectros de hidrogênio. O uso do preenchimento do final do FID com zeros, *zero-filling*, é feito pela adição de pontos no domínio temporal do espectro, sendo recomendado para auxiliar na definição da forma de linha.

Cuidados com a fase do espectro também são essenciais, pois desvios na forma de linha alteram a intensidade dos sinais. Outra fonte de erros surge de distorções na linha de base do espectro, com origem no receptor do espectrômetro. Quando se integra a linha de base, o valor encontrado deve ser zero, pois se trata de uma região livre de sinais. Uma consideração final em relação à integração dos sinais do espectro de hidrogênio é em relação ao início e ao final da área integrada, em uma medida quantitativa a região de integração deve cobrir 99% do sinal.

Levando-se em conta todos esses fatores, a concentração de ácido acético presente nos vinagres pode ser calculada utilizando-se a equação 8²⁹.

$$C_x = C_s \frac{N_s A_x}{N_x A_s} \quad \text{equação 8}$$

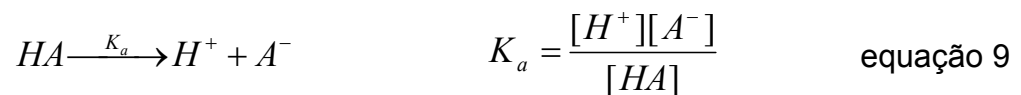
C_s e C_x : Concentração do padrão e de ácido acético, respectivamente.

N_s e N_x : Número dos hidrogênios das metilas do padrão e do ácido acético, respectivamente.

A_s e A_x : Área dos sinais de RMN para as metilas do padrão e do ácido acético, respectivamente.

1.3.3.2 Titulação ácido-base

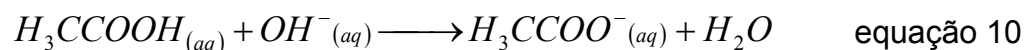
O ácido acético é um ácido fraco, isso significa que ele não está dissociado completamente no equilíbrio entre os íons e a molécula não dissociada



O ácido acético possui um valor de $K_a = 1,75 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ e, conseqüentemente, o valor de $pK_a = 4,757$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁵³.

De acordo com a instrução normativa 83/1999 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento⁴, o vinagre deve conter pelo menos 4% de ácido acético, o que corresponde a uma solução aquosa de concentração 0,67M. A titulação desse vinagre pode ser feita utilizando uma solução de hidróxido de sódio de concentração conhecida e padronizada previamente tornando possível determinar a concentração do ácido e a acidez do vinagre.

A equação para a reação ácido-base é



Como o pH aumenta mais rapidamente no início da titulação, ele tem uma mudança pequena na região do ponto de equivalência. Nesse ponto a solução contém basicamente acetato de sódio. Esse fator torna a escolha do indicador muito importante. O ponto de equivalência ocorre em pH aproximadamente igual a 9 e, portanto, a fenolftaleína, com ponto final em pH 9, é um bom indicador para essa titulação⁵⁴.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais desse trabalho são:

- 1) Implementar o uso da técnica SNIF-NMR no laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.
- 2) Utilizar a RMN como ferramenta analítica para a determinação da origem biossintética do ácido acético em amostras de vinagres comerciais.
- 3) Determinar as porcentagens de ácido acético, provenientes de vinho e de álcool da cana-de-açúcar, utilizados nas misturas chamadas de *agrins*.
- 4) Avaliar a quantificação da acidez via RMN quando comparada com a titulação ácido-base.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SNIF-NMR

3.1.1 O Padrão Interno

Foram testadas duas substâncias que poderiam ser utilizadas como padrão intermolecular nos experimentos de RMN de ^1H e ^2H , sendo elas, *N,N*-dimetilformamida (DMF) e *N,N*-tetrametiluréia (TMU). Foram transferidos ao primeiro tubo de RMN de 5 mm 600 μL de vinagre comercial de maçã e 100 μL de uma solução 8% (v/v) de TMU (fabricante: Aldrich Chemical Company), e no segundo tubo mantemos o volume de vinagre e adicionamos 100 μL de DMF 99,5% (fabricante: Merck S. A.). Os espectros de RMN de ^1H foram realizados utilizando-se a seqüência de pulsos zgcprr para fazer a supressão do sinal da água, isso possibilitou a localização dos sinais dos hidrogênios das metilas desses compostos e do ácido acético, cuja integração forneceu os dados para o cálculo da relação isotópica do ácido presente nos vinagres.

Os espectros foram adquiridos com os mesmos parâmetros, ou seja, número de aquisição (NS: 16), tempo de aquisição (AQ: 8,18 s), número de pontos utilizados na aquisição do espectro (TD: 65536), janela espectral (SWH: 4000 Hz), tempo de espera entre as aquisições (D1: 1 s), atenuação do pulso de pré-saturação (PL9: 60 dB), duração do pulso de 90° (P1: 10,5 μs), e o valor do ganho do receptor (RG: 64). Foram adicionadas cinco gotas de D_2O para ajustar a homogeneidade do campo magnético. No processamento foi utilizado o preenchimento por zeros, *zero-filling*, isto é, a utilização do mesmo número de pontos que na aquisição do espectro (SI: 65536) e a multiplicação exponencial *Line Broadening* (LB: 0,3 Hz). Foi feita a correção automática da linha de base.

3.1.2 A Extração do Ácido Acético

Com o intuito de aumentar a concentração de ácido acético nas amostras, para melhor se estabelecer a relação entre a integração dos sinais de ^1H e ^2H , foram feitas extrações do ácido acético do vinagre utilizando um extrator contínuo líquido/líquido, do tipo Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente. Foram utilizados aproximadamente 80 mL de vinagre e 150 mL de éter etílico. O tempo de extração foi cerca de vinte e quatro horas. Ao término das extrações, as amostras foram concentradas utilizando-se um evaporador rotativo e suas massas determinadas. Na figura 3.1 podemos ver uma ilustração do extrator contínuo utilizado.

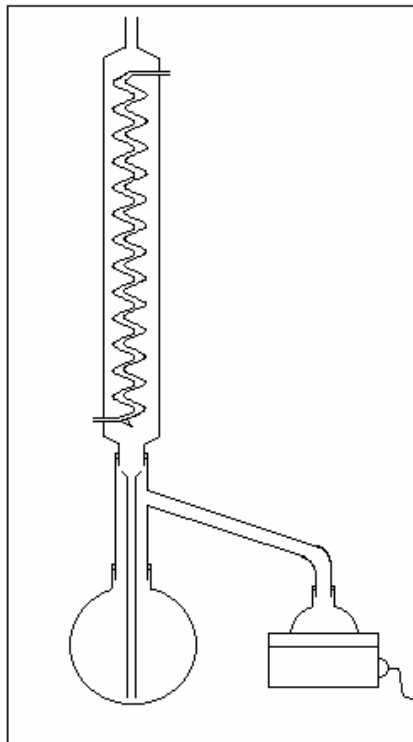


FIGURA 3.1 – Ilustração de um extrator contínuo líquido/líquido.

Em seguida, 600 μL do ácido acético extraído, ainda contendo traços de água, etanol e éter etílico, foram transferidos a um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro juntamente com uma quantidade pré-conhecida (100 μL) do padrão TMU 99%, e submetidos às análises de RMN de ^1H e de ^2H , obtidos no equipamento DRX400 BRUKER de 9,4 Tesla (400,13 MHz para frequência do hidrogênio e 61,42 MHz para a frequência do deutério), e a uma temperatura de 300K. A sonda utilizada

foi a BBO (*Broad Band Observe*), pois a detecção do deutério é feita na bobina mais próxima da amostra. Esses experimentos foram realizados em triplicata e estão descritos a seguir.

3.1.3 Os espectros de RMN de ^1H

Todos os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos nas mesmas condições, ou seja: seqüência de pulsos (pulprog: zg), NS: 16, AQ: 8,39 s, TD: 65536, SWH: 3906 Hz, D1: 5 s, P1: 10,5 μs e RG: 1,6. No processamento foi utilizado o preenchimento por zeros, *zero filling*, e foi feita a correção automática da linha de base. Não foi utilizada a multiplicação exponencial *Line Broadening* (LB).

3.1.4 Os espectros de RMN de ^2H

Os espectros de RMN de ^2H foram adquiridos logo após aos dos hidrogênios. Os mesmos parâmetros foram mantidos para todos os espectros, ou seja: seqüência de pulsos (pulprog: zgdc), NS: 128, AQ: 8,59 s, TD: 10280, SWH: 3906 Hz, D1: 5 s, P1: 17,5 μs e RG: 128. No processamento foi utilizado SI: 4096, a multiplicação exponencial *Line Broadening* (LB: 3,0 Hz) e foi feita a correção automática da linha de base.

Os espectros de RMN de ^2H foram feitos sem a utilização do canal que corrige as variações no campo magnético, *lock* na frequência de ^{19}F .

3.1.5 O Cálculo da Relação Isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$

Após a realização dos espectros de RMN de ^1H foi feita a integração dos sinais referentes aos hidrogênios das metilas do ácido acético e da *N,N*-tetrametiluréia. Ajustando-se o valor da integral do sinal do TMU para um (1) e utilizando a equação 8 calculamos a concentração de ácido no tubo de RMN. Para a realização do cálculo foram utilizadas as seguintes informações:

C_s : Concentração do padrão utilizado = 1,19 mol L⁻¹.

N_s : Número de hidrogênios da metila do ácido acético = 3.

N_x : Número de hidrogênios das metilas do padrão = 12.

A_s : Área do sinal de RMN para as metilas do padrão = 1.

Com o valor da concentração do ácido pode-se, em seguida, calcular a sua massa no tubo. Com o valor da massa do ácido e a área dos sinais da metila do padrão e do ácido obtidos no espectro de deutério é possível calcular a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ do vinagre analisado.

O cálculo da relação isotópica foi feito utilizando a equação 7 e substituindo os valores da massa de ácido acético calculada para cada tubo (mA), juntamente com as informações a seguir:

$(^2\text{H}/^1\text{H})^{\text{P}}$: Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ do padrão (TMU) = 135,00 ppm¹⁸.

NA: Número de hidrogênios da metila do ácido acético = 3.

NP: Número de hidrogênios das metilas do padrão = 12.

mP: Massa do padrão = 0,097 g.

MA: Massa molar do ácido acético = 60,05 g mol⁻¹.

MP: Massa molar do padrão = 116,16 g mol⁻¹.

3.1.6 As Amostras Analisadas

Durante a realização desse trabalho dez amostras de vinagres comerciais e três amostras padrões foram analisadas com o objetivo de determinar a origem biossintética dos mesmos. A tabela 3.1 resume as informações principais a respeito dessas amostras.

TABELA 3.1 – Descrição e origem das amostras de vinagre analisadas.

Amostra de vinagre	Descrição da amostra	Origem
Maçã 1	Vinagre comercial obtido pela fermentação de maçã	São Carlos – SP
Maçã 2	Vinagre comercial obtido pela fermentação de maçã	São Carlos – SP
Vinho	Vinagre autêntico obtido pela fermentação de vinho	Rio Grande do Sul
Vinho branco 1	Vinagre comercial obtido pela fermentação de vinho branco	São Carlos – SP
Vinho branco 2	Vinagre comercial obtido pela fermentação de vinho branco	São Carlos – SP
Vinho tinto 1	Vinagre comercial obtido pela fermentação de vinho tinto	São Carlos – SP
Vinho tinto 2	Vinagre comercial obtido pela fermentação de vinho tinto	São Carlos – SP
Vinho tinto 3	Vinagre caseiro obtido pela fermentação de vinho tinto	Realeza – PR
Mel	Vinagre autêntico obtido pela fermentação de mel	Rio Grande do Sul
Arroz	Vinagre comercial obtido pela fermentação de arroz	São Carlos – SP
Abacaxi	Vinagre autêntico obtido pela fermentação de abacaxi	Rio Grande do Sul
Álcool 1	Vinagre comercial obtido pela fermentação de álcool	São Carlos – SP
Álcool 2	Vinagre comercial obtido pela fermentação de álcool	São Carlos – SP

Em adição a essas amostras de vinagre foi analisada uma amostra de ácido acético sintético.

3.1.6.1 Os *Agrins*

Existem alguns tipos de vinagre que são chamados de *agrin* ou fermentado acético de álcool e vinho. A acidez dessas amostras é descrita como sendo igual a 4%, mas as porcentagens de álcool e vinho que lhes dão origem não são informadas, por isso surgiu o interesse de estudá-las. Para isso uma curva de calibração foi construída utilizando-se amostras de vinagres de álcool (comercial) e de vinho (autêntico). As proporções utilizadas desses dois vinagres estão na tabela 3.2. A partir dessa curva as amostras de interesse, que são comerciais, foram analisadas e verificou-se sua localização na curva, determinando assim, a porcentagem de cada um dos dois constituintes.

TABELA 3.2 – Proporções dos vinagres de vinho e álcool utilizados na construção da curva de calibração.

Proporções de vinagre (%)		Amostra
Vinho	Álcool	
100	0	Vinho
80	20	VA8020
60	40	VA6040
40	60	VA4060
20	80	VA2080
0	100	Álcool 2

A tabela 3.3 mostra uma descrição das quatro amostras de *agrins* comerciais analisadas durante o trabalho.

TABELA 3.3 – Descrição e origem das amostras de *agrins* analisadas.

Amostra de vinagre	Descrição do produto comercial	Origem
<i>Agrin 1</i>	Fermentado acético de álcool e vinho branco	São Carlos – SP
<i>Agrin 2</i>	Fermentado acético de álcool e vinho branco	São Carlos – SP
<i>Agrin 3</i>	Fermentado acético de álcool e vinho branco	São Carlos – SP
<i>Agrin 4</i>	Fermentado acético de álcool e vinho tinto	São Carlos – SP

3.2 Supressão do Sinal da Água

Com a intenção de obter uma supressão eficiente do sinal referente aos hidrogênios da água, foram testadas duas seqüências de pulsos, zgpr e zgcpr. Os espectros de RMN de ^1H realizados para comparar a eficiência das mesmas foram obtidos no equipamento ARX200 BRUKER de 4,7 Tesla (200 MHz para a freqüência do hidrogênio) e adquiridos nas seguintes condições: NS: 16, AQ: 9,24 s, TD: 65536, SWH: 3546 Hz, D1: 1 s, PL9: 60 dB, P1: 5,12 μs , e RG: 90. Foram utilizadas cinco gotas de D_2O para ajustar a homogeneidade do campo magnético. No processamento foi utilizado *zero-filling* e a multiplicação exponencial *Line Broadening* (LB: 0,3 Hz). Foi feita a correção automática da linha de base.

3.3 Determinação da Acidez do Vinagre

3.3.1. Via RMN de ^1H

Para a medida quantitativa do ácido acético foram transferidos ao tubo de RMN de 5 mm 600 μL de vinagre e 100 μL de uma solução de TMU 8% (v/v). Em seguida, foram adicionadas cinco gotas de D_2O para ajuste da homogeneidade do campo magnético. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A partir da escolha da técnica que foi a mais eficientemente na supressão do sinal do solvente, ou seja, a seqüência de pulsos zgcprr, os espectros de RMN de ^1H foram obtidos no equipamento DRX400 BRUKER de 9,4 Tesla, utilizando-se a sonda BBI (*Broad Band Inverse*), onde observamos o núcleo de hidrogênio na bobina mais interna da sonda, mais próxima da amostra.

Na aquisição dos espectros de RMN de ^1H das diferentes amostras todos os parâmetros foram mantidos, ou seja: NS: 16, AQ: 7,44 s, TD: 65536, SWH: 4400 Hz, D1: 1 s, PL9: 60 dB, P1: 10,5 μs . O valor do ganho do receptor (RG) foi ajustado para cada experimento com o intuito de obter a melhor relação sinal/ruído. No processamento foi utilizado *zero-filling* e foi feita a correção automática da linha de base.

Após a aquisição e processamento dos espectros, a integração dos sinais dos hidrogênios das metilas do ácido acético e do TMU foi realizada, ajustou-se a integral dos hidrogênios da metila do TMU para o valor unitário e anotou-se o valor referente aos hidrogênios da metila do ácido.

O cálculo da concentração do ácido acético em cada amostra de vinagre foi realizado utilizando-se a equação 8. Para a realização desse cálculo utilizou-se as seguintes informações:

C_s : concentração do padrão utilizado = 0,096 mol L^{-1} .

N_s : Número de hidrogênios da metila do ácido acético = 3.

N_x : Número de hidrogênios das metilas do padrão = 12.

A_s : Área do sinal de RMN para as metilas do padrão = 1.

3.3.2 Via Titulação

A acidez dos vinagres analisados também foi verificada via uma titulação ácido-base. Para isso, utilizou-se o hidróxido de sódio como base.

A padronização da solução de NaOH (0,6 M) foi feita utilizando o padrão primário ftalato ácido de potássio, $KC_8H_5O_4$. A fenolftaleína foi usada como indicador. As amostras de vinagre foram tituladas com o hidróxido de sódio padronizado, adicionando-se 5 mL de vinagre a um erlenmeyer, e 5 gotas de fenolftaleína, essas titulações foram feitas em triplicatas.

3.4 Teste de Exatidão

O teste de exatidão para a quantificação do ácido acético foi feito, realizando-se os experimentos de RMN de 1H , em triplicata, utilizando-se soluções de ácido acético 3% e 6% (v/v), obtendo assim, o valor experimental para a concentração do ácido, que foi em seguida relacionado ao valor teórico⁵⁵ de acordo com a equação 11⁵⁶.

$$\%Exatidão = \frac{Conc. \cdot obtida}{Conc. \cdot teórica} 100 \quad \text{equação 11}$$

3.5 Teste de Precisão

3.5.1 SNIF-NMR

A repetibilidade do método foi testada pela análise estatística dos resultados obtidos no cálculo da relação isotópica $^2H/^1H$ de todos os experimentos realizados, mas em especial para uma amostra de vinagre de maçã comercial, chamada de maçã 1, onde todo o procedimento foi repetido três vezes, desde a extração até a obtenção dos espectros e cálculo da relação isotópica. Os experimentos de RMN de 2H e 1H também foram feitos em triplicata.

O teste da reprodutibilidade foi feito trocando-se o operador e utilizando a mesma seqüência na realização do experimento para uma amostra de vinagre de vinho tinto anteriormente analisada, chamada de vinho tinto 2, essa nova análise foi realizada após cinco meses.

3.5.2 Determinação da Acidez do Vinagre

A repetibilidade foi testada analisando-se os resultados obtidos no cálculo da concentração de ácido acético em todas as amostras analisadas, sendo que os experimentos foram feitos em triplicata.

A reprodutibilidade do método também foi verificada, como para SNIF-NMR, trocando-se o operador, que realizou o mesmo procedimento para a quantificação, para uma amostra de vinagre de vinho tinto já analisada, chamada de vinho tinto 2, essa nova análise foi realizada após quatro meses.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SNIF-NMR

A técnica SNIF-NMR pode ser utilizada tanto na determinação da origem biossintética como na avaliação da autenticidade de um composto de interesse. No presente estudo, vinagres comerciais de várias fontes foram estudados na avaliação das suas origens biossintéticas e autenticidades, que pode ser feita por meio do cálculo da relação isotópica, em que essa técnica se baseia, porém é necessário fazer os espectros de RMN de ^1H e ^2H com os parâmetros de aquisição e processamento corretamente ajustados.

Um dos requisitos na otimização dos experimentos foi a escolha do padrão intermolecular. O próximo item contém uma comparação entre dois padrões que poderiam ser utilizados.

4.1.1 O Padrão Interno

As duas substâncias testadas e que poderiam ser utilizadas como padrão intermolecular foram a *N,N*-dimetilformamida (DMF) e a *N,N*-tetrametiluréia (TMU). Apesar de ser o TMU o padrão utilizado quando se faz experimentos de RMN de ^2H em abundância natural⁴¹, o espectro de RMN de ^1H utilizando o DMF foi adquirido almejando verificar se ele poderia ser um padrão mais adequado.

As figuras 4.1 e 4.2 mostram os espectros de RMN de ^1H com supressão do sinal da água, usando a seqüência de pulsos zgcppr, para um vinagre comercial de maçã onde essas duas substâncias foram adicionadas. A figura 4.1 mostra o espectro de RMN de ^1H utilizando o padrão DMF, e a figura 4.2 utilizando o padrão TMU.

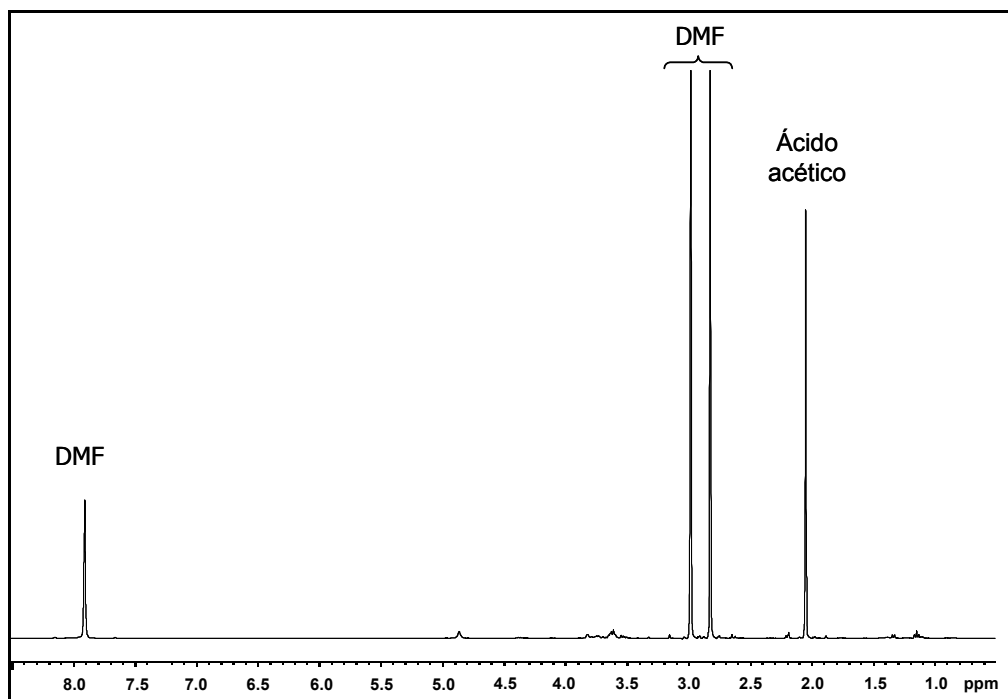


FIGURA 4.1 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de maçã, utilizando o padrão DMF e a seqüência de pulsos zgcprr para a supressão do sinal da água. Foram adicionadas cinco gotas de D_2O para ajustar a homogeneidade do campo magnético.

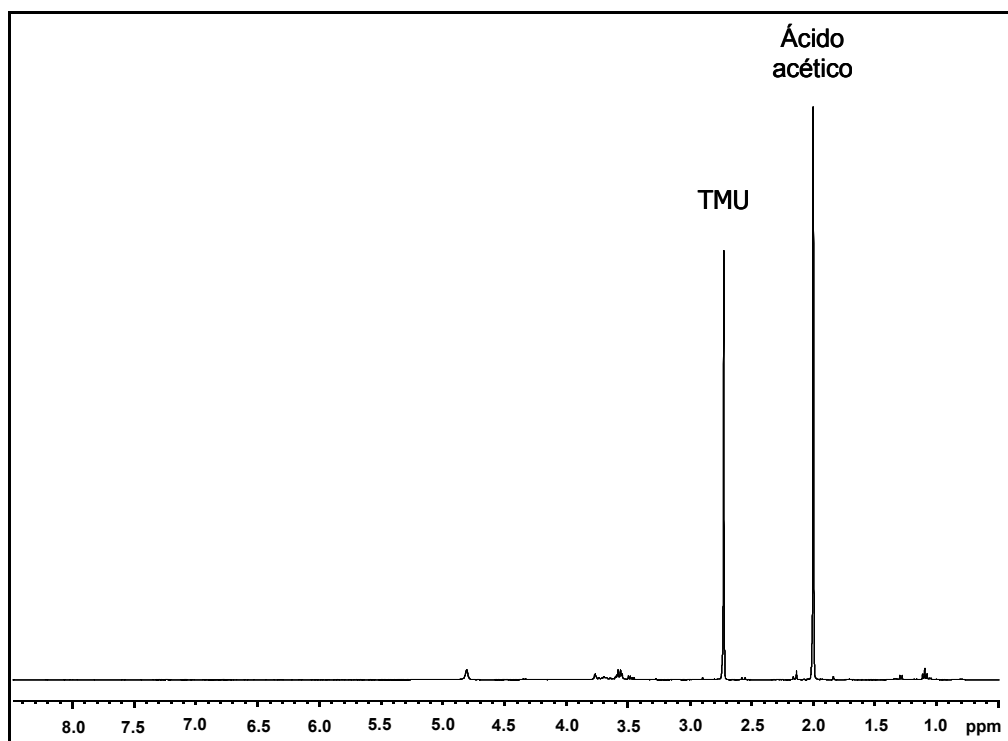


FIGURA 4.2 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de maçã, utilizando o padrão TMU e a seqüência de pulsos zgcprr para a supressão do sinal da água. Foram adicionadas cinco gotas de D_2O para ajustar a homogeneidade do campo magnético.

Analisando-se o segundo espectro, figura 4.2, verificou-se a presença de somente um singlete (2,72 ppm) além do sinal do ácido acético (2,05 ppm). Já no primeiro espectro, figura 4.1, verificou-se a presença de três singletos (2,83, 2,98 e 7,91 ppm), além do sinal do ácido acético. Sendo essencial que o padrão apresente o menor número de sinais no espectro e que esteja suficientemente próximo ao sinal de interesse, foi feita a escolha pela *N,N*-tetrametiluréia para ser utilizada como o padrão intermolecular tanto no método de SNIF-NMR como na determinação da acidez do vinagre.

4.1.2 A Extração do Ácido Acético

A extração do ácido acético dos vinagres se fez necessária devido à grande quantidade de água presente nas amostras, pois quando se fez os espectros de RMN de ^1H sem a extração, verificou-se a presença de um sinal muito intenso, referente à água, em relação aos sinais de interesse, como pode ser visto na figura 4.3.

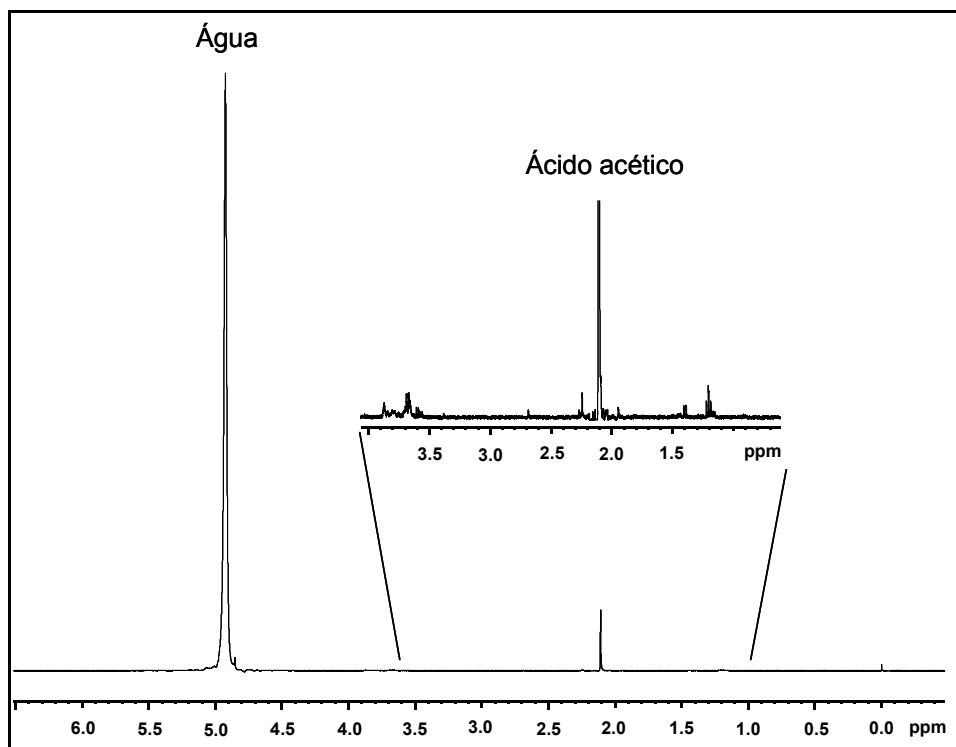


FIGURA 4.3 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de maçã, utilizando a seqüência de pulsos zg (sem supressão do sinal do solvente).

Após cada extração do ácido acético as amostras foram concentradas e suas massas determinadas a partir de 80 g de vinagre, conforme mostrado na tabela 4.1.

TABELA 4.1 – Massas de ácido acético, obtidas após cada extração.

Amostra de vinagre	Massa (g)
Maçã 1	4,0
Maçã 2	4,1
Vinho	8,8
Vinho branco 1	7,3
Vinho branco 2	7,5
Vinho tinto 1	6,9
Vinho tinto 2	5,0
Vinho tinto 3	5,6
Mel	6,7
Arroz	6,1
Abacaxi	9,7
Álcool 1	19,5
Álcool 2	5,9

4.1.3 Os espectros de RMN de ^1H

Após as extrações, as amostras estavam mais adequadas para a realização dos espectros de RMN de ^1H e ^2H , pois a quantidade de água presente era suficientemente pequena permitindo a visualização dos sinais de interesse. Na figura 4.4 pode-se ver um espectro de RMN de ^1H realizado após a extração do ácido acético.

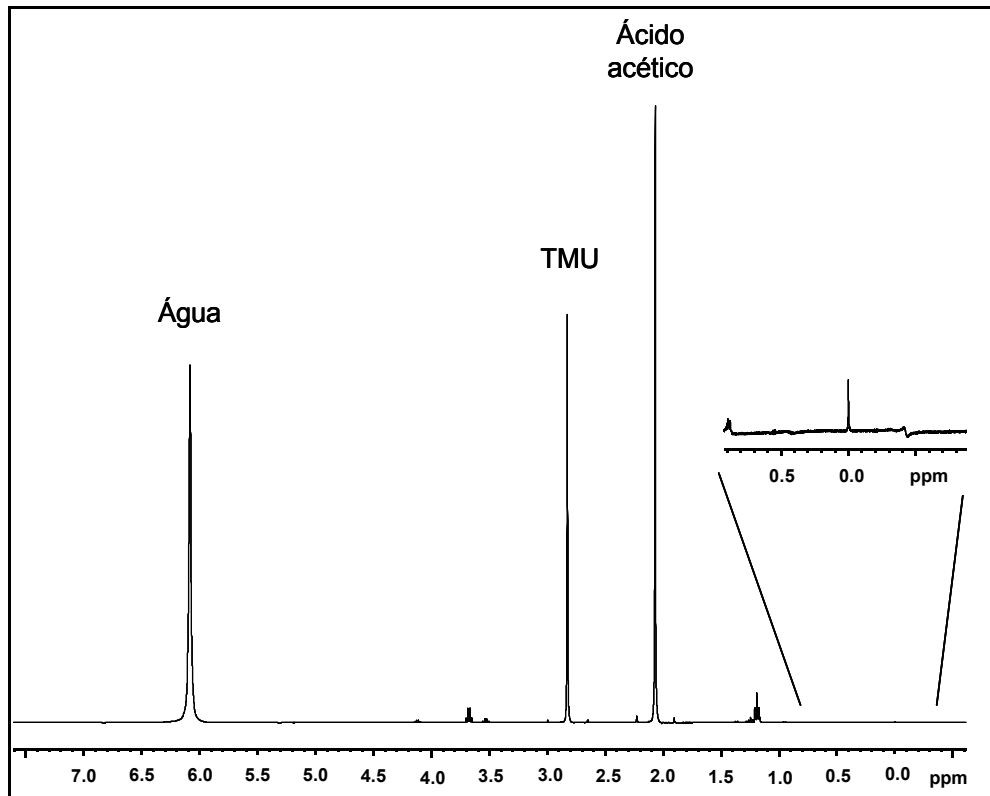


FIGURA 4.4 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de vinho, utilizando o padrão TMU e a seqüência de pulsos zg. Não foi utilizado solvente deuterado.

Na figura 4.4 podem ser vistos os sinais dos hidrogênios referentes à metila do ácido acético (2,04 ppm), do padrão TMU (2,81 ppm) e da água (6,13 ppm). Os dois primeiros são relativamente intensos quando comparados ao da água, visto que para ser possível a visualização deles sem a extração do ácido era necessário fazer a supressão do sinal da água. Esse espectro foi calibrado utilizando a referência interna tetrametilsilano, TMS, que apresenta um único sinal (singleto) em 0,0 ppm, como mostrado na expansão vertical da figura.

4.1.4 Os espectros de RMN de ^2H

Na figura 4.5 observa-se o espectro de RMN de ^2H realizado após a extração do ácido acético, onde podem ser visualizados os sinais que serão integrados para se obter a relação isotópica e, conseqüentemente, se analisar a origem biossintética do vinagre.

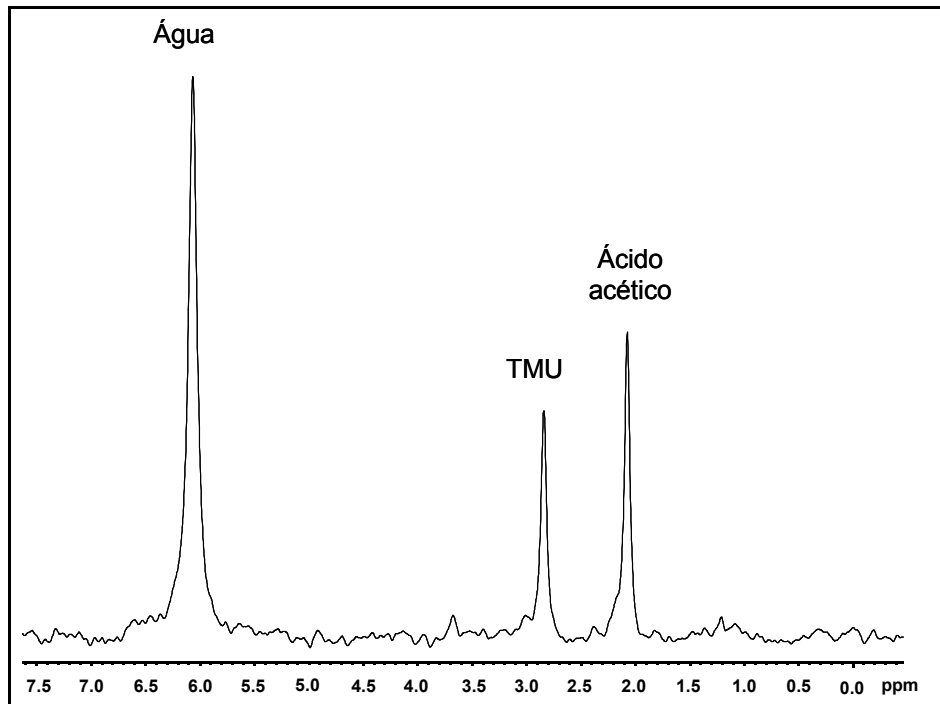


FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ^2H de um vinagre comercial de vinho, utilizando o padrão TMU e a seqüência de pulsos zgdc. Não foi utilizado solvente deuterado.

Os espectros de deutério foram calibrados em relação aos espectros de hidrogênio, pois seus deslocamentos químicos são idênticos¹⁶. Após os espectros de ^1H serem calibrados utilizando o padrão TMS, foi utilizado o valor do deslocamento químico do sinal dos hidrogênios da metila do ácido acético para referenciar os espectros de ^2H .

Como os espectros de RMN de ^1H e ^2H já foram adquiridos e processados adequadamente, o passo seguinte foi o cálculo da relação isotópica, que está descrito abaixo.

4.1.5 O Cálculo da Relação Isotópica

Após a realização dos espectros de RMN de ^1H foi feita a integração dos sinais referentes aos hidrogênios das metilas do ácido acético e do TMU. Depois disso ajustou-se o valor da integral (área) do sinal do TMU para um (1) e anotou-se então o valor da integral do sinal do ácido. Com esse valor calculou-se a sua concentração dentro de cada tubo de RMN, utilizando-se a equação 8. Em seguida, encontrou-se a massa de ácido acético no tubo, tornando possível a realização do cálculo da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ para cada vinagre analisado, utilizando-se a

equação 7. Os valores calculados da massa e da relação isotópica estão na tabela 4.2.

TABELA 4.2 – Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$.

Amostra de vinagre	Massa (g)	Relação Isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)
Maçã 1	0,40	99,8 (\pm 0,4)
Maçã 2	0,08	100,8 (\pm 0,1)
Vinho	0,34	110,7 (\pm 0,1)
Vinho branco 1	0,29	109,5 (\pm 0,5)
Vinho branco 2	0,23	109,2 (\pm 0,2)
Vinho tinto 1	0,29	110,6 (\pm 0,3)
Vinho tinto 2	0,35	110,1 (\pm 0,3)
Vinho tinto 3	0,21	110,6 (\pm 0,3)
Mel	0,34	98,6 (\pm 0,4)
Arroz	0,26	111,8 (\pm 0,2)
Abacaxi	0,29	106,0 (\pm 0,2)
Álcool 1	0,51	129,5 (\pm 0,4)
Álcool 2	0,34	129,9 (\pm 0,2)
Ácido acético sintético	0,59	153,5 (\pm 0,4)

A amostra de ácido acético sintético foi analisada sem a necessidade de fazer a extração, pois a quantidade de água presente era muito pequena, o que permitia uma boa visualização dos sinais de interesse. Ela foi analisada com o intuito de verificar se o valor da relação isotópica obtido experimentalmente seria condizente com o valor encontrado na literatura⁴⁷. Esse estudo mostrou que o valor experimental foi maior que o da literatura (130 – 140 ppm), porém esse acréscimo também foi verificado para a maioria dos vinagres analisados.

Em seguida, passou-se a analisar os vinagres comerciais, sabendo que um valor superior àquele encontrado na literatura não necessariamente se caracterizaria em uma adulteração. Para confirmar ainda mais essa afirmação foram realizados os experimentos com três amostras de vinagres que eram de fontes conhecidas e, portanto, podia-se afirmar que não possuíam adulteração e poder-se-ia utilizar seus valores para comparações futuras. Essas amostras foram chamadas

de vinagres de vinho, mel e abacaxi. Para esses vinagres foram obtidos valores da relação isotópica próximos a 111, 99 e 106 ppm, respectivamente.

Os vinagres de maçã apresentaram valores médios da relação isotópica em torno de 100 ppm, sendo que a macieira utiliza o metabolismo biossintético C_3 , como a videira e o arroz. Além disso, o vinagre de mel caracteriza-se por um comportamento semelhante ao dos pertencentes ao grupo C_3 . Todos esses vinagres, portanto, deveriam apresentar valores próximos da relação isotópica, ou variando dentro de uma pequena faixa e ainda próximos ao valor obtido para a amostra autêntica de vinagre de vinho.

O valor obtido experimentalmente para os vinagres comerciais de vinho, tanto tinto como branco, estão próximos a 110 ppm. Se comparados esse valor com o valor obtido para o vinagre de vinho sem adulteração, pode-se dizer que são muito próximos e até menores, mostrando que não foram adulterados.

O vinagre de mel apresentou um valor da relação isotópica próximo a 99 ppm. Não foram encontrados estudos na literatura referentes a esse tipo de vinagre, no entanto verificamos valores em torno de 100 ppm para o etanol obtido a partir da fermentação do mel⁴⁴ e sabendo-se que os conteúdos isotópicos das metilas do etanol e do ácido acético são próximos³⁶ pode-se esperar que um vinagre de mel apresente valores da relação $^2H/^1H$ na faixa de 100 – 110 ppm como os demais vinagres pertencentes ao grupo C_3 . O valor encontrado está apenas um pouco inferior ao esperado, mas sabendo que se trata de um vinagre autêntico pode-se afirmar que esse valor é confiável.

Não foram encontrados estudos sobre vinagres de arroz, mas sabendo que o arroz utiliza o metabolismo C_3 ⁴³ pode-se esperar que ele apresente comportamento semelhante às demais plantas pertencentes a esse grupo, e isso foi verificado pelo valor da relação isotópica, próximo a 112 ppm.

Os valores da relação isotópica para os vinagres obtidos a partir de plantas C_3 estão, portanto, na faixa de 99 a 112 ppm, aproximadamente 10 ppm maiores que os valores da literatura, sendo que os vinagres de maçã e mel apresentaram os menores valores e os de vinho e arroz os maiores valores. Os valores encontrados na literatura estão na tabela 4.3.

TABELA 4.3 – Valores teóricos ou da literatura da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ para vinagres.

Composto	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)
C ₃	90 – 100 ⁴⁷
C ₄	110 ⁴⁷
CAM	105 ²⁴
Ácido acético sintético	130 – 140 ⁴⁷

Os vinagres obtidos a partir de plantas C₄ apresentaram valores da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ superiores aos de C₃, como era esperado. Os vinagres de álcool, obtidos da cana-de-açúcar, apresentaram valores próximos a 130 ppm, superiores aos da literatura, mas essas amostras provavelmente não foram adulteradas, pois a cana-de-açúcar é uma das fontes abundantes e de menor custo em nosso país, não havendo justificativas para tal adulteração. Se ocorresse algum caso de adulteração a probabilidade maior seria que se utilizasse o etanol da cana-de-açúcar para ser adicionado a um produto de custo mais elevado ou cuja obtenção fosse mais difícil.

O abacaxi apresenta o mecanismo biossintético CAM, sendo que as plantas que seguem esse mecanismo realizam os dois ciclos, C₃ e C₄, e seus valores da relação isotópica encontrados na literatura são intermediários aos valores desses dois grupos. Portanto, um vinagre de abacaxi deveria apresentar o valor da relação isotópica intermediário ao dos de vinagres C₃ e C₄. O valor obtido experimentalmente foi igual a 106 ppm, concordante com o da literatura, mas se analisá-lo juntamente com todos os valores obtidos experimentalmente dever-se-ia classificar essa amostra como sendo pertencente ao grupo C₃, pois o valor obtido está dentro da faixa encontrada para esse grupo. Assim, pode-se dizer que utilizando a técnica SNIF-NMR não foi possível classificar corretamente um vinagre do grupo CAM, havendo então a necessidade de se analisar um número maior de vinagres pertencentes a esse grupo, que, no entanto, existem pouquíssimas amostras comerciais.

4.1.5.1 Os Agrins

Na análise dos vinagres conhecidos como *agrins*, foi construída uma curva de calibração, misturando-se, nas proporções mostradas na tabela 3.2, nos materiais e métodos, os vinagres após a extração, denominados de vinho e álcool 2.

Para a construção dessa curva primeiramente foram encontrados os valores da massa de ácido acético dentro de cada tubo e, em seguida, foi calculada a relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$. Esses valores estão na tabela 4.4.

TABELA 4.4 – Valores médios da massa de ácido acético no tubo e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (para a curva de calibração).

Amostra de vinagre	Massa (g)	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)
Vinho	0,34	110,7 ($\pm 0,1$)
VA8020	0,30	114,6 ($\pm 0,3$)
VA6040	0,30	117,8 ($\pm 0,2$)
VA4060	0,31	121,9 ($\pm 0,3$)
VA2080	0,33	127,3 ($\pm 0,3$)
Álcool 2	0,34	129,7 ($\pm 0,2$)

Utilizando esses valores de relação isotópica construiu-se a curva de calibração que está ilustrada na figura 4.6.

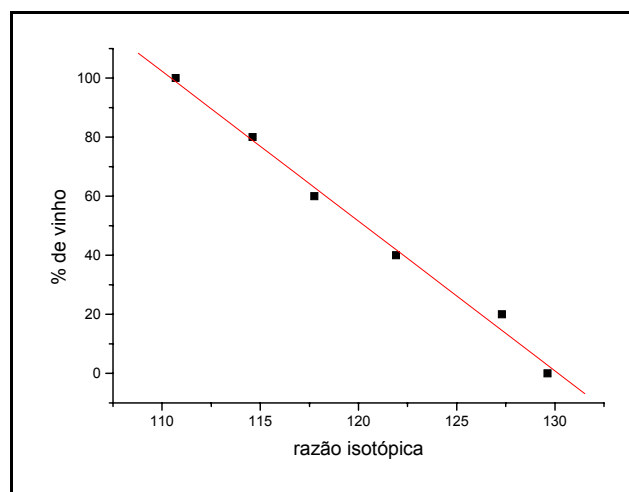


FIGURA 4.6 – Curva de calibração ($R = -0,99$).

A partir da reta obtida nesse gráfico foi possível encontrar uma equação igual a

$$Y = 660,5 + (-5,1) * X \quad \text{equação 12}$$

Onde Y = % de vinagre de vinho na amostra.

X = valor da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ obtido pelo método SNIF-NMR.

Após a construção da curva de calibração analisou-se a porcentagem, por comparação com os valores mostrados na tabela 4.4, de cada um dos dois tipos de vinagres que está presente nos *agrins*. Para isso procedeu-se igualmente para os vinagres, ou seja, foi realizado para cada um deles o procedimento todo, desde a extração do ácido acético até o cálculo da relação isotópica. A tabela 4.5 contém as massas obtidas após cada extração a partir de 80 g de vinagre.

TABELA 4.5 – Massa de ácido acético, obtida após cada extração, para os *agrins*.

Amostra de vinagre	Massa (g)
<i>Agrin 1</i>	12,4
<i>Agrin 2</i>	8,8
<i>Agrin 3</i>	6,4
<i>Agrin 4</i>	6,2

Após a concentração das amostras, foram realizados os espectros de RMN de ^1H e ^2H , em triplicata, para ser feita a integração dos sinais. Com os valores da área dos sinais das metilas do TMU e do ácido acético do espectro de RMN de ^1H calculou-se a massa de ácido dentro de cada tubo. Em seguida, foi feito o cálculo da relação isotópica, cujos valores foram comparados com os obtidos pela curva de calibração, e assim foi possível verificar as porcentagens dos vinagres oriundos de plantas que apresentam mecanismo fotossintético C_3 (uva) e C_4 (cana-de-açúcar).

Os valores da massa e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ dos *agrins* analisados estão na tabela 4.6.

TABELA 4.6 – Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ para os *agrins*.

Amostra de vinagre	Massa (g)	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)
<i>Agrin 1</i>	0,43	129,3 ($\pm 0,2$)
<i>Agrin 2</i>	0,21	124,3 ($\pm 0,2$)
<i>Agrin 3</i>	0,40	117,6 ($\pm 0,2$)
<i>Agrin 4</i>	0,35	115,2 ($\pm 0,2$)

Analisando primeiramente os valores da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ obtidos para os *agrins*, sem substituir esses valores na equação da reta (equação 12), verificou-se que a primeira amostra, *agrin 1*, apresentou o valor da razão $^2\text{H}/^1\text{H}$ muito próximo ao valor obtido para a amostra que continha ácido acético proveniente do álcool, mostrando que esse vinagre não contém a presença do ácido vindo do vinho, ou que este deve estar em uma quantidade muito pequena. O fato de se fabricar um vinagre somente a partir do etanol da cana-de-açúcar e no rótulo do frasco afirmar-se que esse produto é composto por álcool e vinho pode se caracterizar em uma adulteração.

As demais amostras apresentaram valores inferiores da relação isotópica, sendo que a segunda amostra, nomeada de *agrin 2*, mostrou valores mais elevados que as seguintes, indicando que na sua composição havia uma maior quantidade de ácido acético proveniente do etanol da cana, mas também havia ácido obtido a partir do vinho, estando de acordo com o que está escrito no rótulo do frasco, pois esse não informa as proporções de ambos os constituintes.

Utilizando-se a equação da reta pode-se calcular as porcentagens de ácido acético, provenientes do vinho e do álcool em cada amostra estudada. Esses valores, juntamente com o seu preço no mercado local, estão mostrados na tabela 4.7.

TABELA 4.7 – Porcentagens do ácido acético de vinho e álcool nos *agrins* e seus valores no mercado.

Amostra de vinagre	Porcentagem de vinagre (%)		Preço (R\$)
	Vinho	Álcool	
<i>Agrin 1</i>	4,6	95,4	0,95
<i>Agrin 2</i>	29,9	70,1	0,98
<i>Agrin 3</i>	63,7	36,3	1,08
<i>Agrin 4</i>	76,0	24,0	1,05

Analisando agora as porcentagens obtidas, confirma-se o que foi dito anteriormente, que o valor da relação isotópica para a primeira amostra, *agrín 1*, indica uma quantidade muito grande do vinagre de álcool, 95%, enquanto que a amostra *agrín 4* apresenta uma porcentagem maior de vinagre de vinho, 76%. A análise desses vinagres mostrou que muitas vezes o vinagre comprado no supermercado pode ser composto basicamente de vinagre de álcool, que possui uma qualidade e preço inferior ao do vinagre de vinho, como é o caso do *agrín 1*, mas também pode-se comprar um *agrín* que contém 76% de vinagre de vinho, *agrín 4*, possuindo uma qualidade superior a da amostra *agrín 1*. Em resumo, pode-se dizer que a descrição do rótulo não é suficiente para caracterizar adequadamente o produto.

4.2 Supressão do Sinal da Água

Nos espectros de RMN de ^1H realizados, como o que está mostrado na figura 4.7, verifica-se a presença de um sinal muito intenso (4,82 ppm – hidrogênios da água) impossibilitando a visualização dos outros sinais, que somente podem ser vistos na expansão mostrada na figura.

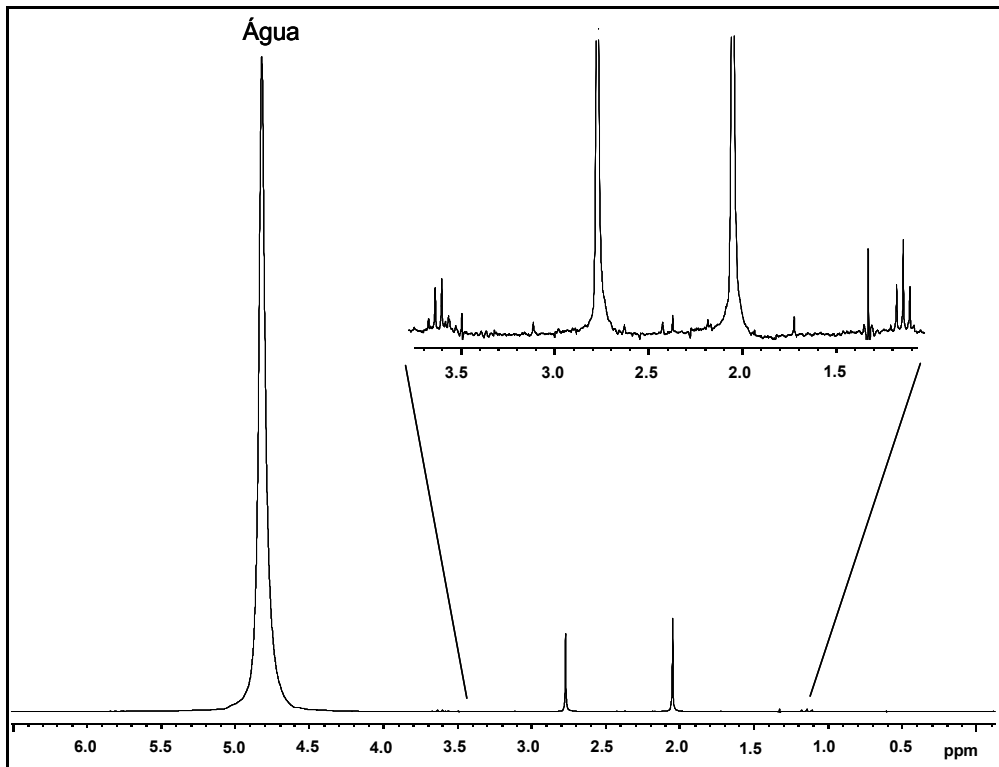


FIGURA 4.7 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de vinho branco, utilizando a seqüência de pulsos zg, que não usa técnica de supressão.

Nesse experimento não foi utilizado nenhum tipo de seqüência de pulsos para fazer a supressão do sinal do solvente, por isso é necessária a sua utilização, já que o sinal intenso da água dificulta a análise dos outros sinais da amostra.

As figuras seguintes (4.8 e 4.9) mostram que há um ganho na relação sinal/ruído dos espectros quando se realiza a supressão do sinal da água. A figura 4.8 mostra um espectro de RMN de ^1H utilizando a seqüência de pulsos zgpr para a supressão do sinal da água, e a figura 4.9 um espectro de RMN de ^1H utilizando a seqüência de pulsos zgcprr.

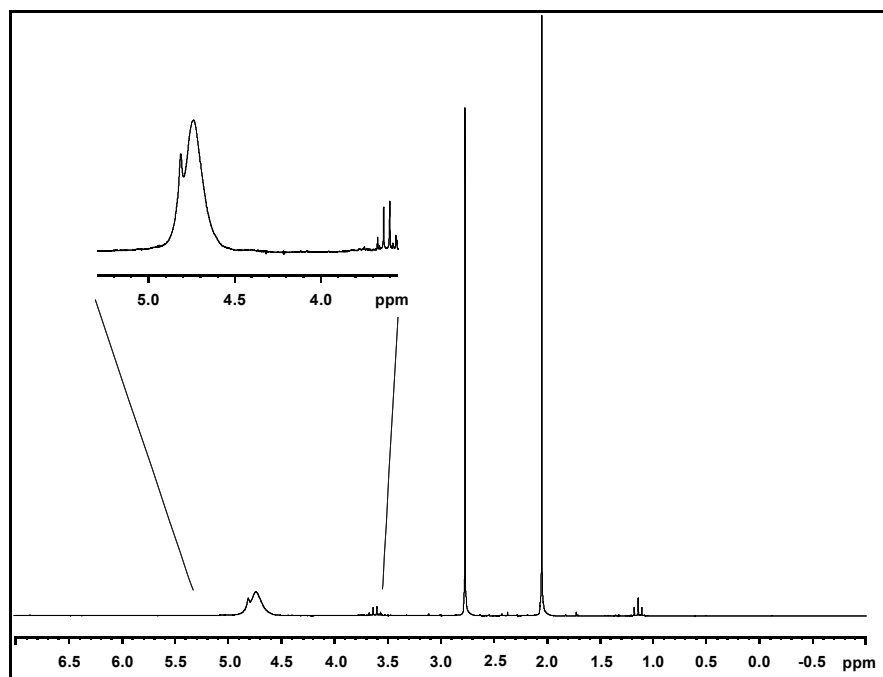


FIGURA 4.8 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de vinho branco, utilizando a seqüência de pulsos zgpr para a supressão do sinal da água.

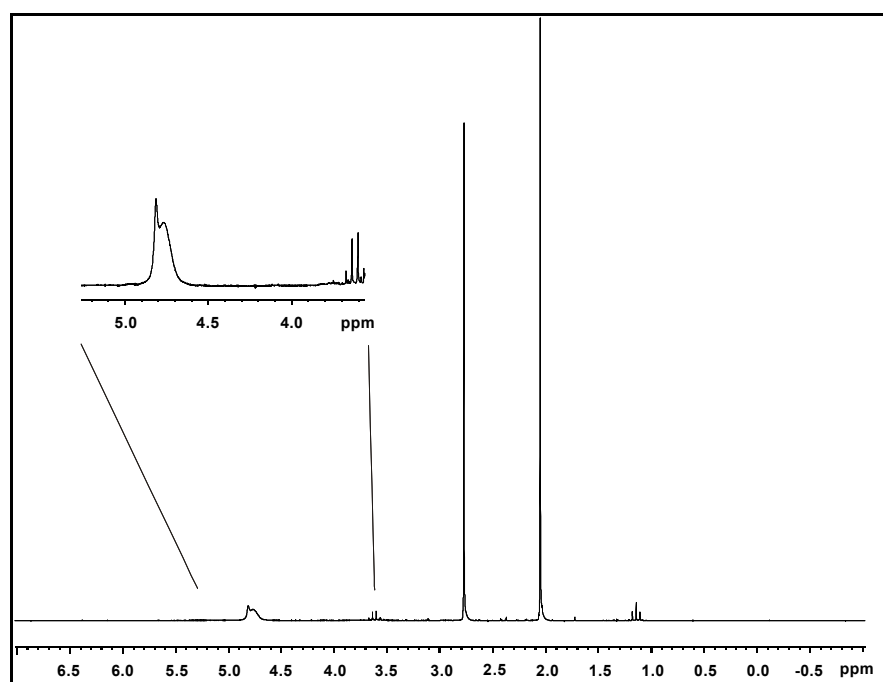


FIGURA 4.9 – Espectros de RMN de ^1H de um vinagre comercial de vinho branco, utilizando a seqüência de pulsos zgcprr para a supressão do sinal da água.

Como mostrado acima, nesse trabalho foram testadas duas seqüências de pulsos que realizam a supressão do sinal da água, zgpr e zgcprr (figuras 4.8 e 4.9). Comparando-se os espectros verifica-se que ambas as seqüências suprimem

eficientemente o sinal desejado. Mas se analisarmos as expansões mostradas nas figuras vemos que a seqüência zgcppr suprimiu melhor (com uma pequena diferença) o sinal da água, sendo escolhida para ser utilizada nos espectros de determinação da acidez dos vinagres.

A seqüência zgpr tem sido utilizada na rotina do nosso laboratório e a seqüência zgcppr está começando a ser usada, e já existem trabalhos onde a zgcppr tem sido mais eficiente, como na análise de cafés⁵⁷, obtendo-se uma relação sinal/ruído satisfatória em todo o espectro. Além disso, as freqüências próximas ao sinal suprimido não foram afetadas, permitindo a visualização de sinais nessa região.

4.3 Determinação da Acidez do Vinagre

4.3.1 Via RMN de ^1H

São feitas varias exigências quanto aos parâmetros de aquisição e processamento do espectro de RMN de ^1H quando esse é utilizado em uma medida quantitativa, como pode ser verificado no item 1.3.3.1 na introdução. Nesse sentido, a figura 4.10 mostra um espectro onde todas essas exigências foram obedecidas.

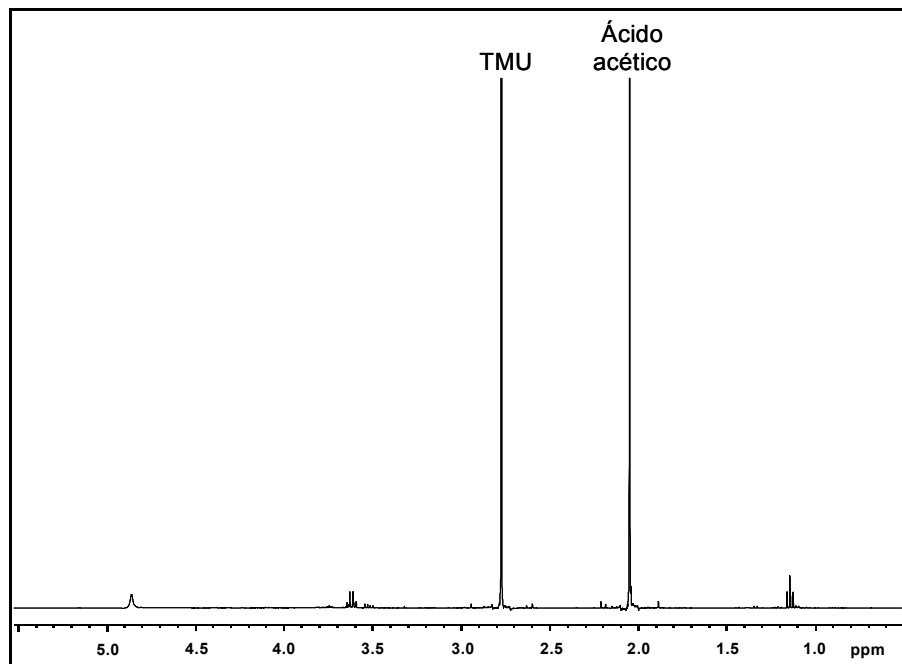


FIGURA 4.10 – Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de vinho tinto, utilizando a seqüência zgcppr para a supressão do sinal da água.

Após a realização do espectro de RMN de ^1H e da integração dos sinais referentes aos hidrogênios das metilas do padrão e do ácido acético, sendo o valor da integral do TMU ajustado para um, foi possível calcular a concentração do ácido acético utilizando a equação 8 e a sua massa no vinagre analisado. Conseqüentemente, foi obtido o valor da acidez desse vinagre. Na tabela 4.8 estão mostrados os valores da massa calculada para as amostras e a acidez em porcentagem.

TABELA 4.8 – Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da acidez dos vinagres analisados.

Amostra de vinagre	Massa (10^{-2} g)	Acidez do vinagre (%)
Maçã 1	2,8	4,1 ($\pm 0,1$)
Maçã 2	0,7	1,0 ($\pm 0,0$)
Vinho	4,0	5,7 ($\pm 0,0$)
Vinho branco 1	2,5	3,6 ($\pm 0,3$)
Vinho branco 2	2,8	4,1 ($\pm 0,2$)
Vinho tinto 1	3,0	4,3 ($\pm 0,0$)
Vinho tinto 2	2,5	3,6 ($\pm 0,0$)
Vinho tinto 3	2,6	3,8 ($\pm 0,3$)
Mel	3,1	4,3 ($\pm 0,1$)
Arroz	2,5	3,6 ($\pm 0,3$)
Abacaxi	4,7	6,8 ($\pm 0,1$)
Álcool 2	2,5	3,6 ($\pm 0,1$)
<i>Agrin 2</i>	2,8	4,0 ($\pm 0,1$)
<i>Agrin 3</i>	2,8	4,0 ($\pm 0,0$)
<i>Agrin 4</i>	2,7	3,9 ($\pm 0,2$)

Analisando-se essa tabela pode-se ver que a acidez dos vinagres varia de 1 a 7%, mostrando que algumas amostras possuem quantidades maiores de ácido acético que as outras. Os valores mínimos permitidos por lei são de 4% e com isso verifica-se que apenas uma amostra (maçã 2 - vinagre artesanal) não obedece a essa exigência, apresentando somente 1% de acidez. Por isso, foi dado um pouco mais de atenção para essa amostra e observou-se uma quantidade apreciável de etanol. O espectro de RMN de ^1H com supressão do sinal da água está mostrado na

figura 4.11, onde foi possível verificar que o menor sinal (2,1 ppm) é referente aos hidrogênios da metila do ácido acético, enquanto que os sinais do etanol (1,2 ppm – metila e 3,6 ppm – metilena) são mais intensos.

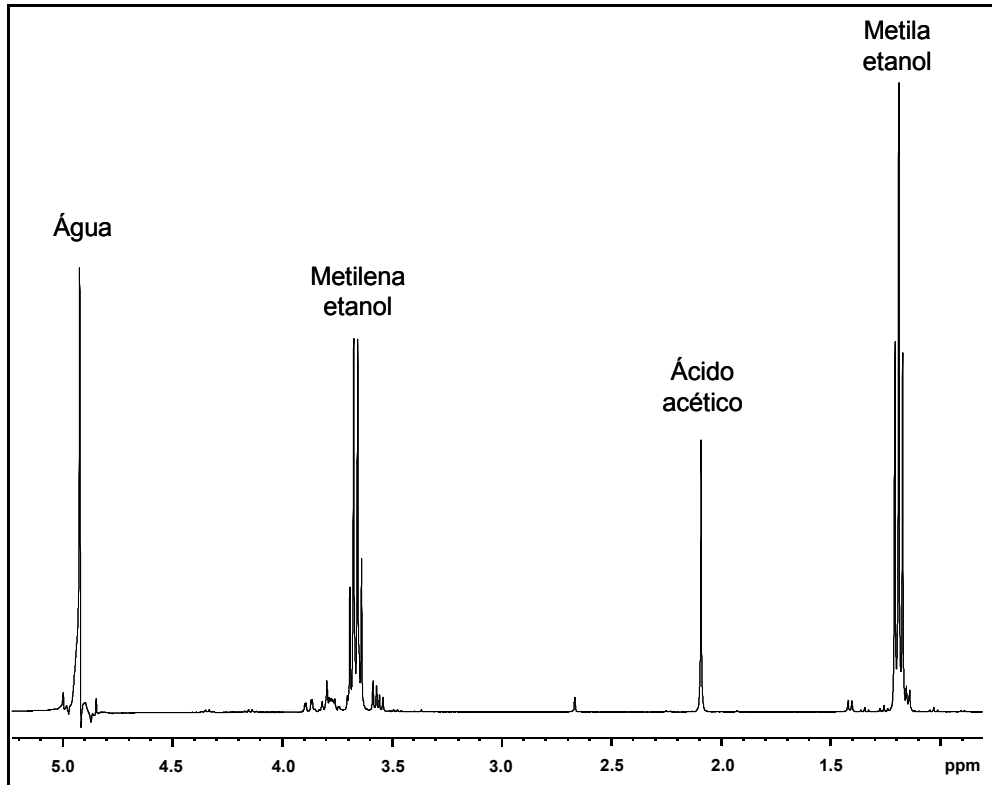


FIGURA 4.11 - Espectro de RMN de ^1H de um vinagre artesanal de maçã (maçã 2), utilizando a seqüência zgpcpr para a supressão do sinal da água.

Analisando-se uma amostra de vinagre comercial de maçã (maçã 1) foi observada uma situação contrária, ou seja, a presença de uma grande quantidade de ácido acético, igual a 4,1%, em relação à quantidade de etanol, que não foi possível de ser quantificada, enquanto que no vinagre artesanal verificamos o inverso; uma quantidade grande de etanol, 4,3%, e pequena de ácido acético, 1%.

Na figura 4.12 está mostrado o espectro de RMN de ^1H com supressão do sinal da água para a vinagre maçã 1, para que seja possível visualizar a diferença entre esses dois tipos de vinagre. Nesse espectro foi verificado um sinal muito intenso (2,1 ppm) referente aos hidrogênios da metila do ácido acético. Os sinais do etanol (1,2 e 3,6 ppm) estão praticamente encobertos pelo ruído, mostrando que a quantidade de etanol nessa amostra é muito menor que no vinagre artesanal mostrado na figura 4.11. Os demais vinagres analisados também possuem

uma quantidade muito pequena de etanol em relação ao ácido acético, mostrando que o processo de fermentação acética foi bem eficiente.

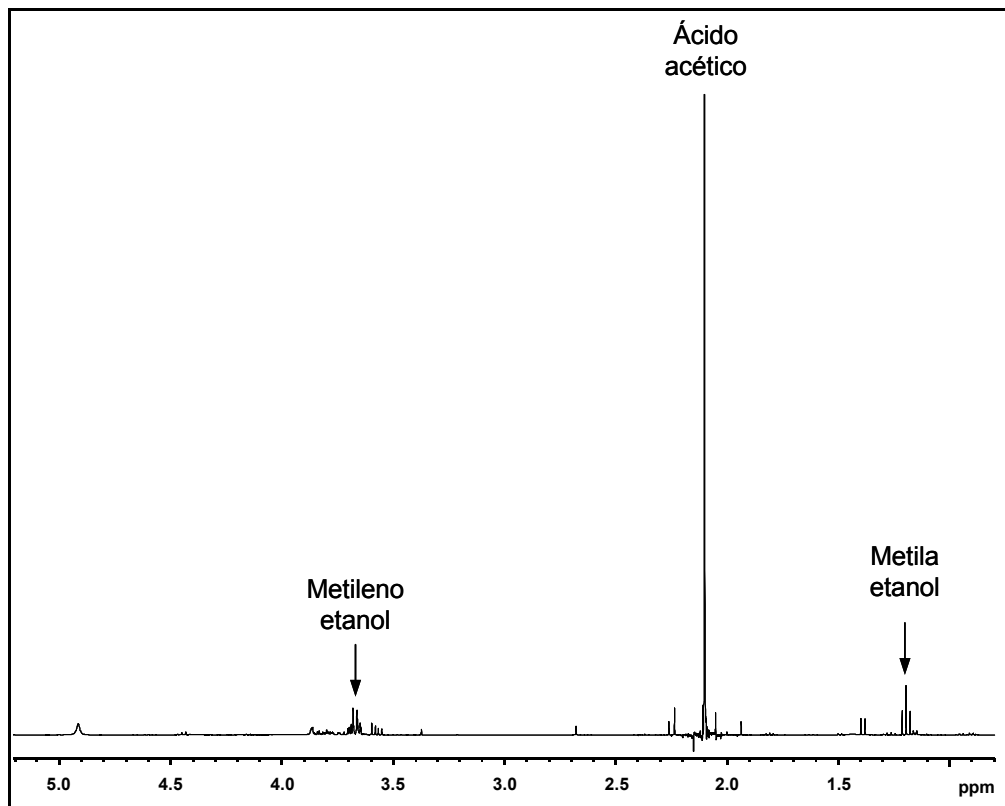


FIGURA 4.12 - Espectro de RMN de ^1H de um vinagre comercial de maçã (maçã 1), utilizando a seqüência zgcprr para a supressão do sinal da água.

O que se pode concluir em relação ao vinagre artesanal de maçã é que o seu processo de fermentação não foi completado, permanecendo nessa amostra uma grande quantidade de etanol. Se compararmos essas duas amostras, em termos de qualidade, pode-se concluir que o vinagre industrialmente produzido possui uma qualidade superior ao vinagre artesanal.

4.3.2 Via Titulação

O objetivo principal de utilizar a titulação, que é um método mais fácil e mais barato que a RMN e que fornece resultados confiáveis, foi para verificar se os resultados obtidos por RMN seriam condizentes com os obtidos pela titulação e, portanto, confiáveis, sendo essa uma técnica quantitativa que poderia ser utilizada em estudos semelhantes a esse. Um outro objetivo foi verificar se a acidez

encontrada por esses dois métodos era concordante com o valor descrito no rótulo do frasco de vinagre.

Na tabela 4.9 estão mostrados os volumes da solução de NaOH que foram utilizados para titular o ftalato ácido de potássio. Como essa padronização foi feita em triplicata e sabendo-se a molaridade real do ftalato (0,7 M), utilizou-se o volume médio de NaOH para calcular a sua molaridade.

TABELA 4.9 – Volumes de NaOH utilizados para titular o $\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$.

Volumes de NaOH (mL)	
Primeira replicata	11,0
Segunda replicata	10,8
Terceira replicata	11,1
Média	11,0

A partir desses valores foi encontrada uma concentração igual a 0,6 M para a solução de NaOH. Em seguida começou-se a titular as amostras de vinagre utilizando a solução de NaOH previamente padronizada e as titulações foram feitas em triplicata. A acidez do vinagre foi calculada a partir de cada volume de NaOH utilizado para neutralizar o ácido acético. Na tabela 4.10 estão mostrados os volumes de NaOH utilizados, e os valores da acidez, em porcentagem.

TABELA 4.10 – Volume de NaOH utilizado para titular 5 mL de vinagre e a acidez calculada.

Amostra de vinagre	Volumes de NaOH (mL)	Acidez (%)
Maçã 1	6,2	4,3 ($\pm 0,1$)
Maçã 2	1,6	1,0 ($\pm 0,1$)
Vinho	8,9	6,2 ($\pm 0,1$)
Vinho branco 1	5,9	4,0 ($\pm 0,0$)
Vinho branco 2	5,8	4,1 ($\pm 0,0$)
Vinho tinto 1	6,1	4,2 ($\pm 0,1$)
Vinho tinto 2	5,7	4,0 ($\pm 0,1$)
Vinho tinto 3	6,1	4,2 ($\pm 0,2$)
Mel	7,0	4,8 ($\pm 0,1$)
Arroz	5,6	4,0 ($\pm 0,0$)
Abacaxi	10,1	7,0 ($\pm 0,1$)
Álcool 2	5,8	4,0 ($\pm 0,0$)
<i>Agrin 2</i>	6,1	4,1 ($\pm 0,0$)
<i>Agrin 3</i>	5,7	4,0 ($\pm 0,0$)
<i>Agrin 4</i>	6,1	4,2 ($\pm 0,0$)

Pela titulação foram confirmados os valores de acidez encontrados por RMN, que variam de 1 a 7%.

Os valores da acidez do vinagre encontrados por RMN, por titulação e o valor do frasco estão apresentados na tabela 4.11 para que possa ser feita uma comparação entre eles.

TABELA 4.11 – Valores para comparação da acidez dos vinagres.

Amostra de vinagre	Acidez (%)		
	RMN	Titulação	Frasco
Maçã 1	4,1 (\pm 0,1)	4,3 (\pm 0,1)	4,2
Maçã 2	1,0 (\pm 0,0)	1,0 (\pm 0,1)	não consta
Vinho	5,7 (\pm 0,0)	6,2 (\pm 0,1)	não consta
Vinho branco 1	3,6 (\pm 0,3)	4,0 (\pm 0,0)	4,0
Vinho branco 2	4,1 (\pm 0,2)	4,1 (\pm 0,0)	4,0
Vinho tinto 1	4,3 (\pm 0,0)	4,2 (\pm 0,1)	4,0
Vinho tinto 2	3,6 (\pm 0,0)	4,0 (\pm 0,1)	4,0
Vinho tinto 3	3,8 (\pm 0,3)	4,2 (\pm 0,2)	não consta
Mel	4,3 (\pm 0,1)	4,8 (\pm 0,1)	não consta
Arroz	3,6 (\pm 0,3)	4,0 (\pm 0,0)	4,0
Abacaxi	6,8 (\pm 0,1)	7,0 (\pm 0,1)	não consta
Álcool 2	3,6 (\pm 0,1)	4,0 (\pm 0,0)	4,0
<i>Agrin 2</i>	4,0 (\pm 0,1)	4,1 (\pm 0,0)	4,0
<i>Agrin 3</i>	4,0 (\pm 0,0)	4,0 (\pm 0,0)	4,0
<i>Agrin 4</i>	3,9 (\pm 0,2)	4,2 (\pm 0,0)	4,0

Analisando essa tabela verifica-se que os valores da acidez calculados por RMN estão próximos aos da titulação, além disso, estão igualmente próximos aos informados nos rótulos dos frascos. Portanto, pode-se afirmar que a RMN pode ser utilizada como uma técnica quantitativa.

4.4 Teste de Exatidão

A exatidão do método de determinação da acidez dos vinagres foi calculada utilizando a equação 11. A concentração de ácido acético encontrada pela RMN foi de 93% em relação à concentração da amostra adicionada ao tubo, ou seja, com a utilização desse método obtemos valores da concentração apenas 7% menores que os valores calculados teoricamente.

4.5 Teste de Precisão

4.5.1 SNIF-NMR

A repetibilidade do método foi avaliada calculando o desvio padrão para todas as amostras estudadas, sendo que esses valores estão apresentados nas tabelas 4.2, 4.4 e 4.6. Para essas medidas foram encontrados valores do desvio padrão que variam de 0,1 a 0,5.

Os resultados de todo o procedimento que foi realizado para o vinagre de maçã comercial (maçã 1) estão apresentados nas tabelas seguintes. Os valores de massa após cada extração estão na tabela 4.12.

TABELA 4.12 – Massas de ácido acético, obtidas após as extrações, para o teste da repetibilidade.

Amostra de vinagre	Massa (g)
Maçã 1a	4,0
Maçã 1b	7,3
Maçã 1c	7,6

Como já foi citado acima, após as extrações foram realizados os espectros de RMN de ^1H e ^2H . A partir da integração dos sinais das metilas do TMU e do ácido acético no espectro de ^1H pôde-se calcular a concentração do ácido dentro do tubo de RMN usando a equação 8 e, conseqüentemente, encontrar o valor da massa do ácido nesse tubo. A partir desse valor, foi feito o cálculo da relação isotópica. Na tabela 4.13 estão os valores calculados da massa de ácido e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ dos vinagres.

TABELA 4.13 – Valores médios da massa de ácido acético no tubo de RMN e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$, para o teste da repetibilidade.

Amostra de vinagre	Massa (g)	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)
Maçã 1a	0,40	99,8 ($\pm 0,4$)
Maçã 1b	0,37	99,9 ($\pm 0,2$)
Maçã 1c	0,28	99,7 ($\pm 0,3$)

Após realização do cálculo da relação isotópica verificou-se a concordância entre os valores obtidos para as três amostras analisadas, e pelo desvio padrão, que é relativamente pequeno, e pode-se concluir que o método é repetível.

A reprodutibilidade do método também foi testada. O procedimento de análise foi repetido por um operador diferente e após cinco meses. A amostra utilizada foi um vinagre de vinho tinto (2b). O procedimento iniciou-se pela extração do ácido acético. Os valores de massa após ambas as extrações estão na tabela 4.14.

TABELA 4.14 – Massas de ácido acético, obtidas após as extrações, para o teste da reprodutibilidade.

Amostra de vinagre	Massa (g)
Vinho tinto 2a	5,00
Vinho tinto 2b	6,16

A concentração de ácido no tubo de RMN foi calculada e, conseqüentemente, sua massa. Em seguida, foi realizado o cálculo da relação isotópica de $^2\text{H}/^1\text{H}$ para as duas amostras. Na tabela 4.15 estão os valores da massa de ácido acético dentro do tubo e da relação isotópica.

TABELA 4.15 – Valores médios da massa de ácido acético e da relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$, para o teste da reprodutibilidade.

Amostra de vinagre	Massa (g)	Relação isotópica $^2\text{H}/^1\text{H}$ (ppm)
Vinho tinto 2a	0,35	110,1 ($\pm 0,3$)
Vinho tinto 2b	0,31	110,2 ($\pm 0,3$)

Após a realização do cálculo da relação isotópica verificou-se, novamente, a concordância entre os valores obtidos para as duas amostras analisadas, e pelo desvio padrão, que é relativamente pequeno, e pode-se concluir que o método é reprodutível.

4.5.2 Determinação da Acidez do Vinagre

A repetibilidade da técnica de RMN de ^1H foi verificada pelo desvio padrão calculado nessa análise quantitativa. Esses valores estão apresentados nas tabelas 4.8. Foram encontrados valores que variam de 0,0 a 0,3. Sendo esses valores suficientemente pequenos pode-se concluir que esse método é repetível.

A reprodutibilidade dessa técnica também foi testada. Os valores da acidez calculados em ambos os experimentos foram iguais a 3,6 %, mostrando que esse método é reprodutível.

5. CONCLUSÕES

As conclusões a respeito desse trabalho são as seguintes:

1) Foi implementado o uso da técnica SNIF-NMR no laboratório de RMN mesmo não tendo o dispositivo de *lock* de ^{19}F no espectrômetro. Os resultados mostram que para as análises executadas não foram observados desvios significativos do campo magnético (*drifts*).

2) A origem biossintética do ácido acético foi determinada para os vinagres oriundos de plantas que utilizam os metabolismos biossintéticos C_3 e C_4 . Para os vinagres originados de plantas CAM não foi possível estabelecer a sua origem biossintética, pois seus valores coincidiam com os valores encontrados para o grupo C_3 .

3) Foi possível determinar a porcentagem de ácido acético, provenientes da fermentação da uva e da cana-de-açúcar, nos *agrins*.

4) A determinação da acidez via RMN e por titulação forneceram resultados condizentes, estando próximos aos indicados nos rótulos dos produtos comerciais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/vinagre.asp>. Acesso em: 28/09/2002.
2. <http://www.maputo.co.mz/article/articleview/569>. Acesso em: 15/05/2003.
3. SACHS, I. G. *Vinagre*. Bandeirantes: Departamento de Ciências Biológicas e Tecnologia da Fundação Faculdades de Agronomia Luiz Meneghel, 2001. Disponível em: <<http://200.203.137.2/guilherme/VINAGRE.pdf>>. Acesso em: 25/11/2003.
4. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, artigo 83, inciso IV, instrução normativa nº 36, Brasília, 14 de outubro de 1999.
5. <http://www.jampers.hpg.ig.com.br/diversos/vinagre/historia.html>. Acesso em: 15/05/2003.
6. <http://www.vinagreartezana.com.br>. Acesso em: 28/09/2003.
7. <http://culinaria.terra.com.br/culinarua/ingredientes.html>. Acesso em: 28/09/2002.
8. <http://www.portaldoscondominios.com.br/culinaria1.asp>. Acesso em: 15/05/2003.
9. COOMBS, J.; HALL, D. O.; LONG, S. P. & SCURLOCK, J. M. O. *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. New York, Pergamon Press, 2º Edition, 1987.
10. RABINOWITCH, E. & GOVINDJEE *PHOTOSYNTHESIS*. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1969.
11. MARTINEZ, C. A. *Aspectos Básicos da Fotossíntese*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <<http://www.ufv.br/DBV/PGFVG/FOTO12.htm>>. Acesso em: 25/11/2003.
12. PIERCE, S.; WINTER, K. & GRIFFITHS, H. "Carbon isotope ratio and extent of daily CAM use of Bromeliaceae." *New Phytologist*, **156**: 75 – 83, 2002.

13. HALL, D. O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOG, R. C. & LONG, S. P. *Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A Field and Laboratory Manual*. New York, Chapman & Hall, 1995.
14. DENNIS, M. J. "Recent developments in food authentication." *The Analyst*, **123**, 151R – 156R, 1998.
15. BELTON, P. S.; COLQUHOUM, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILLO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, K. & SPRAUL, M. "Application of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: Discrimination between apple varieties." *Food Chemistry*, **61**: 207 – 213, 1998.
16. ASHURT, P. R., *Analytical methods of food authentication*. London, Blackie Academic and Professional. 1998.
17. CORDELLA, C.; MOUSSA, I.; MARTEL, A.-C.; SBIRRAZZUOLI, N. & LIZZANI-CUVELIER, L. "Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique oriented perspectives." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 1751 – 1764, 2002.
18. MARTIN, G. J.; GUILLOU, C.; MARTIN, M. I.; CABANIS, M. T.; TEP, Y. & AERNY, J. "Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**: 316 – 322, 1988.
19. KOSIR, I. J.; KOCJANJCI, M.; OGRINC, N. & KIDRIC, J. "Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines)." *Analytica Chimica Acta*, **429**: 195 – 206, 2001.
20. MARTIN, M.; MARTIN, G. J. & GUILLOU, C. "A site-specific and multi-element isotopic approach to origin inference of sugars in food and beverages." *Mikrochimica Acta*, **II**: 81 – 91, 1991.
21. REMAUD, G.; MARTIN, Y.-L.; MARTIN, G. G.; NAULET, N. & MARTIN, G. J. "Authentication of mustard oils by combined stable isotope analysis (SNIF-NMR and IRMS)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 1844 – 1848, 1997.
22. BAUER-CHRISTOPH, C.; CHRISTOPH, N.; AGUILAR-CISNEROS, B. O.; LÓPEZ, M. G.; RICHLING, E.; ROSSMANN, A. & SCHREIER, P. "Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses." *European Food Research and Technology*, **217**: 438 – 443, 2003.
23. ZHANG, B. -L.; FALLOURD, V.; ROLE, C. & MARTIN, G. J. "Comparison of isotopic fractionation in lactic acid and ethanol fermentations." *Bioorganic Chemistry*, **31**: 227 – 236, 2003.
24. ZHANG, B.-L.; BILLAULT, I.; LI, X.; MABON, F.; REMAUD, G. & MARTIN, M. "Hydrogen isotopic profile in the characterization of sugars. Influence of the metabolic pathway." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (6): 1574 – 1580, 2002.

25. MARTIN, G.G.; MARTIN, Y. L.; NAULET, N. & MCMANUS, H. J. D. "Application of ^2H SNIF-NMR and ^{13}C SIRA-MS analyses to maple syrup: Detection of added sugars." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 3206 – 3213, 1996.
26. MARTIN, G. J.; SUN, X. Y.; GUILLOU, C. & MARTIN, M. L. "NMR determination of absolute site-specific natural isotope ratios of hydrogen in organic molecules. Analytical and mechanistic applications." *Tetrahedron*, **41** (16), 3285 – 3296, 1985.
27. REMAUD, G.; GUILLOU, C.; VALLET, C. & MARTIN, G. J. "A coupled NMR and MS isotopic method for the authentication of natural vinegars." *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **342**: 457 – 461, 1992.
28. ZHANG, B. -L.; BUDDRUS, S. & MARTIN, M. L. "Site-specific hydrogen isotope fractionation in the biosynthesis of glycerol." *Bioorganic Chemistry*, **28**: 1 – 15, 2000.
29. LEYDEN, D. E. & COX, R. H. *Analytical Applications of NMR*. New York, Wiley-Interscience Publication, 1977, v. 48.
30. BRAUN, S.; KALINOWSKI, H. -O. & BERGER, S. *100 and More Basic NMR Experiments. A Practical Course*. New York, VCH, 1996.
31. MARTIN, G. J.; MARTIN, M. L. & ZHANG, B. L. "Site-specific natural isotope fractionation of hydrogen in plant products studied by nuclear isotope fractionation." *Plant Cell and Environment* **15**, 1037 – 1050, 1992.
32. CLARIDGE, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Oxford, Pergamon Press, 1999.
33. OGRINC, N.; KOSIR, I. J.; SPANGENBERG, J. E. & KIDRIC, J. "The application of NMR methods for detection of adulteration of wines, fruit juices, and olive oil. A review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **376**: 424 – 430, 2003.
34. OGRINC, N.; KOSIR, I. J.; KOCJANCIC, M. & KIDRIC, J. "Determination of authenticity, region origin, and vintage of Slovenia wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 1432 – 1440, 2001.
35. MARTIN, G. J. & MARTIN, M. L. "Deuterium labeling at natural abundance level as studied by high field quantitative ^2H NMR." *Tetrahedron Letters*, **22** (36): 3525 – 3528, 1981.
36. MARTIN, G. J.; ZHANG, B. L.; NAULET, N.; & MARTIN, M. L. "Deuterium transfer in the bioconversion of glucose to ethanol studied by specific isotope labeling at the natural abundance level." *Journal of the American Chemical Society*, **108**: 5116 – 5122, 1986.
37. MARTIN, G. G.; HANOTE, V.; LEES, M. & MARTIN, Y. -L. "Interpretation of combined ^2H SNIF-NMR and ^{13}C SIRA/MS analysis of fruit juices to detect added sugar." *Journal of AOAC International*, **79** (1): 62 – 72, 1996.

38. MARTIN, G. J.; KOZIET, J.; ROSSMANN, A. & DENNIS, J. "Site-specific natural isotope fractionation in fruit juices determined by deuterium NMR. An European inter-laboratory comparison study." *Analytica Chimica Acta*, **321**: 137 – 146, 1996.
39. MARTIN, G.; GUILLOU, C. & MARTIN; Y. L. "SNIF-NMR for detection of sugar addition to fruit juices." *Fruit Processing*, **5** (8): 246 – 254, 1995.
40. MARTIN, G. J.; MARTIN, M. L.; MABON, F. & MICHON, M. J. "A new method for the identification of the origin of ethanols in grain and fruit spirits: High-field quantitative deuterium Nuclear Magnetic Resonance at the natural abundance level." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **31**: 311 – 315, 1983.
41. ZHANG, B. L.; YUNIANITA & MARTIN, M. L. "Site-specific isotope fractionation in the characterization of biochemical mechanisms. The glycolytic pathway." *The Journal of Biological Chemistry*, **270** (27), 16023 – 16029, 1995.
42. MARTIN, G. G.; WOOD, R. & MARTIN, G. J. "Detection of added beet sugar in concentrated and single strength fruit juices by deuterium Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR method): Collaborative Study." *Journal of AOAC International*, **79** (4): 917 – 928, 1996.
43. GONZALEZ, J.; JAMIN, E.; REMAUD, G.; MARTIN, Y-L.; MARTIN, G. G. & MARTIN, M. "Authentication of lemon juices and concentrates by a combined multi-isotope approach using SNIF-NMR and IRMS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 2200 – 2205, 1998.
44. LINDNER, P.; BERMANN, E. & GAMARNIK, B. "Characterization of citrus honey by deuterium NMR." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 139 – 140, 1996.
45. MARTIN, Y.-L. "Detection of added beet or cane sugar in maple syrup by the site-specific deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR) method: Collaborative study." *Journal of AOAC International*, **84** (5): 1509 – 1521, 1996.
46. VALLET, C.; SAID, R.; RABILLER, C. & MARTIN, M. L. "Natural abundance isotopic fractionation in the fermentation reaction: Influence of the nature of the yeast." *Bioorganic Chemistry*, **24**, 319 – 330, 1996.
47. HERMANN, A. "Determination of D/H isotope ratio in acetic acid from vinegars and pickled products by ^2H -NMR-spectroscopy." *European Food Research and Technology*, **212**: 683 – 686, 2001.
48. RAHMAN, A. U. & CHOUDHARY, I. I. *Solving Problems with NMR Spectroscopy*. San Diego, Academic Press, 1996.
49. PRICE, W. S. "Water signal suppression in NMR spectroscopy." *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Academic Press, **38**: 289 – 354, 1999.
50. DEROME, A. E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*. London, Pergamon Press, 1988, v.6.

51. GIL, V. M. S. & GERALDES, C. F. C. *Ressonância Magnética Nuclear – Fundamentos, Métodos e Aplicações*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.
52. BAX, A. D. “A spatially selective composite 90° radiofrequency pulse.” *Journal of Magnetic Resonance*, **65**: 142 – 145, 1985.
53. HARRIS, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. New York, W. H. Freeman and Company, Fourth Edition, 1995.
54. MASTERTON, W. L.; SLOWINSKI, E. J. & STANITSKI, C. L. *Princípios de Química*. Rio de Janeiro, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., Sexta Edição, 1997.
55. JEFFERY, G. H.; BASSETT, J.; MENDHAM, J. & DENNEY, R. C. *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro – RJ, Editora Guanabara Koogan S.A., 5ª Edição, 1992.
56. CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC. Fundamentos, Estratégias e Validação*. São Carlos – SP, Editora da UFSCar, 2001.
57. TAVARES, L. A. Determinação do Teor de Cafeína e Identificação dos Constituintes Majoritários de Cafés Comerciais Via RMN. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, 2002. Dissertação de Mestrado, 75 p.