

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Trabalho de Conclusão de Curso

Giovanna Maia

**Ressonância Magnética Nuclear na Análise de Suco de Laranja: importantes
aplicações**

São Carlos – SP
2025
Giovanna Maia

Ressonância Magnética Nuclear na Análise de Suco de Laranja: importantes aplicações

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Venancio

São Carlos – SP

2025



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS DEPARTAMENTO
DE QUÍMICA - DQ/CCET**

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905 Telefone: (16)
33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 24/2025/DQ/CCET

**Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso Folha
Aprovação (GDP-TCC-FA)**

FOLHA DE APROVAÇÃO

GIOVANNA MAIA
**RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA ANÁLISE DE SUCO DE LARANJA:
IMPORTANTES APLICAÇÕES**
Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São

Carlos

São Carlos, 04 de julho de 2025

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Tiago Venâncio
Membro da Banca 1	Dra. Jessica Cristina Amaral
Membro da Banca 2	Dra. Marília Vilella Salvador



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Samuel Schwab, Professor(a)**, em 14/07/2025, às 09:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1918151** e o código CRC **6C6DB8EB**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.001933/2024-38

SEI nº 191815

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, amigos e a todos que contribuíram com meu desenvolvimento científico.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui foi um caminho intenso, cheio de desafios, aprendizados e muitas alegrias. E, se hoje consigo escrever essas palavras, é porque tive ao meu lado pessoas incríveis que me sustentaram, me acolheram e acreditaram em mim, mesmo quando eu mesma duvidei.

Agradeço, em primeiro lugar, à minha mãe. Você é minha base, minha força silenciosa e meu porto seguro. Obrigada por todos os sacrifícios que fez por mim, por cada palavra de incentivo, cada cuidado, cada abraço quando eu mais precisei. Nada disso seria possível sem o seu amor incondicional.

Às minhas irmãs, companheiras de vida e de alma, obrigada por estarem sempre comigo, com amor, com risadas, com conselhos sinceros e, principalmente, com presença. Vocês me ajudaram a seguir em frente quando tudo parecia difícil. Dividir a vida com vocês é uma das minhas maiores alegrias.

Ao meu namorado, obrigada por ser meu companheiro nessa jornada, por me lembrar do meu valor nos dias escuros, por me apoiar em cada decisão, por me ouvir com paciência e me amar com constância. Seu amor foi refúgio e impulso ao mesmo tempo.

À minha bisavó, Maria de Lourdes, mesmo que já não esteja presente fisicamente, sua sabedoria, coragem e história me acompanham e me motivam. Você me ensinou o valor da persistência e da simplicidade. Sempre sentirei sua presença nos meus passos e seguirei sempre seu exemplo.

Ao meu pai, agradeço pela presença ao longo do caminho, pelos momentos de escuta e por contribuir, à sua maneira, para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus amigos da faculdade, que viraram família: obrigada por cada troca, cada madrugada estudando, cada momento de riso e de desespero compartilhado. Crescemos juntos e isso me enche de orgulho.

E aos colegas e amigos da JBT, que me incentivaram, compreenderam minha correria e celebraram cada pequena conquista comigo, obrigada por fazerem parte dessa jornada com tanto carinho e respeito.

Este TCC é resultado do esforço de uma só pessoa, mas é também a soma do amor, apoio e parceria de todos vocês. Sou eternamente grata.

RESUMO

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem se destacado como uma ferramenta analítica poderosa na indústria alimentícia, especialmente na caracterização de sucos naturais, como o suco de laranja. Esta técnica permite análises rápidas, precisas e não destrutivas, com capacidade para fornecer informações detalhadas sobre a composição química e o perfil metabólico das amostras. Este trabalho teve como objetivo o levantamento de literatura sobre os fundamentos da RMN e sua aplicação na análise de suco de laranja, com foco na identificação de açúcares, flavonoides e compostos bioativos. Além disso, explorou-se o uso da RMN na diferenciação de amostras com base na origem geográfica, por meio da análise de perfis metabólicos específicos. Também foram discutidas as implicações dessa técnica para o controle de qualidade e a verificação de autenticidade do produto, uma vez que variações na composição química podem indicar adulterações ou alterações no processo produtivo. Por meio de análises uni e multivariadas dos espectros obtidos, foi possível desenvolver modelos robustos para discriminação de origem, quantificação de constituintes e detecção de fraudes, contribuindo significativamente para a rastreabilidade e a padronização na cadeia produtiva do suco de laranja.

Palavras-chave: Ressonância Magnética Nuclear; Suco de laranja Perfil metabólico; Controle de qualidade.

ABSTRACT

The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique has emerged as a powerful analytical tool in the food industry, especially in the characterization of natural juices, such as orange juice. This technique allows for fast, accurate, and non-destructive analyses, with the ability to provide detailed information on the chemical composition and metabolic profile of samples. This study aimed to survey the literature on the fundamentals of NMR and its application in the analysis of orange juice, focusing on the identification of sugars, flavonoids, and bioactive compounds. In addition, the use of NMR in the differentiation of samples based on geographic origin was explored through the analysis of specific metabolic profiles. The implications of this technique for quality control and verification of product authenticity were also discussed, since variations in chemical composition may indicate adulteration or changes in the production process. Through univariate and multivariate analyses of the obtained spectra, it was possible to develop robust models for origin discrimination, quantification of constituents and fraud detection, contributing significantly to traceability and standardization in the orange juice production chain.

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance; Orange juice; Metabolic profile; Quality control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama Adaptado Pela Autora, Mostrando Os Tipos De Amostras Analisadas Por Diferentes Métodos Da Técnica De RMN, Assim Como Os Resultados Obtidos Por Essa Técnica **21**

Figura 2 - Espectro De RMN-1H (400 Mhz), Mostrando O Perfil Dos Sinais Relacionados À Degradação Do Suco De Laranja **22**

Figura 3 - Espectro De RMN-1H De Uma Amostra De Suco De Laranja, Destacando Suas Principais Regiões Importantes Para Serem Analisadas. **24**

Figura 4 - Espectros De Rmn Para As Diferentes Regiões De Estudo, Sendo Hn, Hunan; Hb, Hubei; Sc, Sichuan; Gx, Guangxi. **28**

Figura 5 - Gráficos Das Componentes Principais (Pc1xpc2) , À Esquerda, E PLS-DA a Direita Das Laranjas Doces Em Diferentes Áreas De Produção, Sendo: Hn, Hunan; Hb, Hubei; Sc, Sichuan; Gx, Guangxi. **30**

Figura 6 - Gráfico De Pontuações OPLS-DA **31**

Figura 7 - Espectros De RMN-1H Para Sucos (Puros) De Diferentes Frutas: Maçã (Em Verde), Laranja (Em Laranja) Abacaxi (Em Azul) E Romã (Em Vermelho). **35**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores Dos Espectros De RMN Para Principais Constituintes Do Suco

25

LISTA DE SIGLAS

Acd- Ácido Cítrico
Ace- Ácido Acético
Ala- Alanina
Asp- Ácido Aspártico
DOSY- Diffusion-Ordered Spectroscopy
EM- Espectrometria De Massas
Eth- Etanol
FA- Ácido Fórmico
FA- Ácidos Graxos
FCOJ- Suco Concentrado Congelado
GX - Guangxi
HB- Hubei
HBA- Ácido Hidroxibutírico
HLB- Huanglongbing
HMQC- Correlação De Múltiplos Quanta Heteronuclear
HN- Hunan
HPLC- Cromatografia Líquida De Alta Eficiência
HSQC-TOCSY - Heteronuclear Single Quantum Coherence - Total Correlation Spectroscopy
Lys- Lisina
MAPA- Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento
Nan- Narinigna
OPLS-DA- Análise Discriminante Por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais
PCA- Análise De Componentes Principais
PIB- Produto Interno Bruto
PLS-DA- Análise Discriminante De Mínimos Quadrados Parciais
Pro- Prolina
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
SC- Sichuan
TMSP- Ácido 3-(Trimetilsilil)Propiônico
TOCSY- Total Correlation Spectroscopy
Tre- Treonina

TSP- Solução Tampão De Fosfato Deuterado

Tyr- Tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 A laranja e sua história	10
1.1.2 A importância do suco de laranja da economia brasileira	10
1.1.3 Tipos de suco de laranja	11
1.1.4 Importância da Análise de Composição em Sucos	12
2 OBJETIVOS	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 RMN	16
3.1.2 Tipos de equipamentos de RMN	18
3.1.3 RMN em misturas complexas	18
3.2 Análise de suco de frutas por RMN	20
4 REVISÃO	23
4.1 Uso da técnica para identificação de perfis metabólicos	23
4.2 Uso de identificação de origem geográfica	27
4.2.1 Composição Quantitativa dos Compostos	28
4.2.2 Identificação da Origem Geográfica das Laranjas	29
4.2.3 Implicações para Controle de Qualidade e Autenticidade	33
4.3 Uso de identificação para Adulteração	34
4.3.1 Detecção de Fraudes e Adulterações	36
4.3.2 Comparação com Métodos Convencionais	36
4.3.3 Sucos de Diferentes Tipos de Frutas	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 A laranja e sua história

A laranja é uma das frutas mais populares e consumidas em todo o mundo, faz parte da família *Rutaceae* e do gênero *Citrus* e, embora não se saiba exatamente onde esta fruta cresceu pela primeira vez, existem algumas evidências do cultivo na região da Ásia, mais especificamente no Sudeste Asiático, onde as laranjas foram domesticadas por volta de quatro mil anos a.C (Nicolás, 2024). Supõe-se que as laranjas doces, como são conhecidas hoje, tenham surgido a partir do cruzamento entre a laranja amarga (*Citrus aurantium*) e a tangerina (*Citrus reticulata*) (Lee, 2015).

Em seu contexto histórico, sabe-se que a laranja foi um símbolo de status de riqueza em muitas culturas, sendo cultivada e apreciada por suas qualidades nutricionais e saborosas. A fruta se espalhou para o Ocidente através das rotas comerciais, chegando à Europa por volta do século XV, quando exploradores e comerciantes, como os portugueses e espanhóis, a introduziram em suas colônias nas Américas e no Caribe (Hulme, 1959). Com o passar dos séculos, a laranja então se tornou um alimento de grande destaque, devido ao seu alto teor de vitamina C e propriedades antioxidantes (FAO, 2021).

Com o passar dos anos e o aumento da industrialização, a laranja também ganhou importância econômica, sendo amplamente cultivada e transformada em sucos e outros produtos, e hoje, é um dos principais frutos cultivados no mundo, com milhões de toneladas produzidas anualmente, e continuando a desempenhar um papel fundamental tanto na culinária quanto na medicina tradicional (FAO, 2021).

1.1.2 A importância do suco de laranja da economia brasileira

Além do consumo in natura, vale destacar o consumo do suco, principal produto industrializado (ou não) da citricultura. A produção de suco de laranja no Brasil é uma atividade agrícola de grande importância, sendo o país um dos maiores produtores e exportadores do produto do mundo, responsável por aproximadamente 60% da produção global e 85% das exportações mundiais de suco concentrado congelado (FCOJ) (Neves; Trombin; Conceição, 2010) tendo suas atividades concentradas principalmente em regiões do Sudeste, como São Paulo e Minas Gerais (CitrusBR, 2025).

Em termos do comércio global, as exportações de suco de laranja são uma parte significativa, sendo o Brasil como líder deste mercado. Com destaque ao período de julho de 2023 a maio de 2024, exportando aproximadamente 1,14 milhão de toneladas de suco de laranja concentrado, se fazendo uma forte presença nos mercados internacionais, e os principais destinos incluem países como os Estados Unidos e a União Europeia (CitrusBR, 2025).

A importância econômica do suco de laranja é comprovada pela sua contribuição com o Produto Interno Bruto (PIB) agrícola do Brasil. A cadeia produtiva da laranja, conta do momento desde o cultivo até o processamento e a exportação do suco, gerando dessa forma milhares de empregos diretos e indiretos, promovendo as economias locais e o desenvolvimento rural (Figueiredo; Souza; Caixeta-Filho, 2012).

Dessa forma, o setor citrícola brasileiro tem investido em pesquisa e desenvolvimento, que têm resultado em avanços na produtividade e na qualidade dos frutos. Inovações em práticas agrícolas e tecnologias de processamento têm permitido que o Brasil mantenha sua posição de liderança no mercado global, apesar dos desafios impostos por doenças como o *greening* e as mudanças climáticas (Bassanezi *et al.*, 2011).

O *greening*, também conhecido como Huanglongbing (HLB), é considerado a pior doença da citricultura mundial. É transmitido principalmente pelo psílido *Diaphorina citri* Kuwayama, e é causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Ca. Las). Essa bactéria se aloja no floema da planta, o qual é o tecido responsável pelo transporte da seiva elaborada (produzida na fotossíntese) para todas as partes da planta, incluindo os frutos.

Dessa forma, os frutos das árvores afetadas pelo *greening* apresentam diversos problemas, como tamanho reduzido, deformação, maturação irregular (com uma parte verde e outra alaranjada ou amarelada), além de ter aumento de limonina, um composto que é responsável por causar o amargor ao suco.

1.1.3 Tipos de suco de laranja

O suco de laranja, como é conhecido, é comercializado em diferentes tipos, cada um com características específicas, sendo elas:

- Suco de laranja segundo a legislação brasileira

O Decreto nº 6.871 de 2009 define como suco de laranja (Brasil, 2009), uma bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da laranja madura e sã. O processo de produção deve garantir a qualidade e conservação do suco até o consumo, ressaltando que não

pode conter adição de substâncias estranhas, com exceção das permitidas pela legislação. A adição de aromas e corantes artificiais é proibida.

- Tipos de Suco de Laranja Comercial

Além da definição legal, o suco de laranja comercialmente disponível se apresenta em diferentes formas:

Integral: o qual mantém a concentração natural do suco, sem adição de açúcares.

Concentrado: é o suco, no qual passa por um processo de desidratação parcial para remover parte da água, tornando-o mais concentrado.

Reconstituído: é produzido a partir do suco concentrado diluído em água potável.

1.1.4 Importância da Análise de Composição em Sucos

As mudanças climáticas vêm representando um grande desafio permanente do século XXI, impactando em diversas áreas. Essas mudanças naturais podem estar associadas ao aumento das temperaturas globais e a variabilidade dos padrões de precipitação, além da interferência humana.

O suco de laranja, é um dos produtos que tem sofrido bastante com isso, por se tratar de um produto que possui uma variação natural, devido a fatores como origem, condições de cultivo e processamento, é necessário que se tenha uma padronização dos produtos, a análise de composição química é essencial e deve ser feita lote a lote, para assegurar os padrões e exigências necessários (Silva; Santos; Costa, 2015; IPCC, 2021).

O estresse hídrico, uma das mudanças climáticas, possui ligação direta com o tamanho dos frutos e as alterações químicas no perfil químico e biológico da fruta, impactando diretamente na sua produção.

Além desses problemas apresentados, a citricultura também está sofrendo com o *greening*, que é agravado pelas condições climáticas adversas. O *greening* tem causado danos significativos às plantações de laranja, reduzindo a produção e afetando a qualidade do suco. Estima-se que desde sua detecção em 2004 na Flórida, ele tenha reduzido a produção de citros em algumas regiões em até 70%, impactando negativamente a indústria de sucos (Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007; Rodrigues; Almeida; Ferreira, 2018).

Esses problemas apresentados, ao impactarem a qualidade e disponibilidade dos frutos, podem fazer com que se tenha um aumento no risco de adulteração dos sucos, a qual conta com

práticas de adição de açúcares, corantes, outros sucos e até lavagem da polpa para compensar as alterações sofridas no produto.

Dessa forma, é necessário que se tenha regulamentações rigorosas e análises químicas que sejam precisas para detectar tais práticas, garantindo a segurança do suco e a autenticidade do mesmo (Silva; Santos; Costa, 2015).

No Brasil, os padrões de qualidade são regulamentados pela Instrução Normativa nº 37, de 1º de outubro de 2018. É essa normativa, emitida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que define os parâmetros analíticos para sucos e polpas de frutas, além de listar as frutas e outros quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade previamente estabelecidos (Brasil, 2018).

Com o avanço tecnológico, novas metodologias analíticas têm emergido, destacando-se pela sua capacidade de fornecer informações rápidas e precisas sobre a composição química de sucos. Dentre essas, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) são particularmente relevantes. A RMN possibilita a identificação e quantificação não destrutiva de moléculas, permitindo a determinação de açúcares, ácidos orgânicos e outros metabólitos presentes em sucos. Em contrapartida, a HPLC tem sido extensivamente empregada na separação e quantificação de substâncias como vitaminas e micronutrientes, assegurando a conformidade do suco com os padrões de qualidade exigidos (Colquhoun; Ringwood; Wilson, 1997; Snyder; Kirkland; Dolan, 2011).

É imperativo salientar que a técnica de HPLC, para a detecção dos analitos, requer a acoplagem a um detector. Os mais comumente empregados incluem a Espectrometria de Massas (EM), uma técnica analítica robusta que permite a identificação e quantificação de compostos químicos em uma amostra por meio da medição da razão massa/carga de íons e da elucidação de suas estruturas, e a Espectroscopia UV-Vis, uma metodologia analítica versátil e amplamente utilizada, capaz de detectar uma vasta gama de moléculas ao mensurar a absorção de radiação ultravioleta-visível pela amostra em diferentes comprimentos de onda.

Nesse contexto, a caracterização composicional dos frutos representa uma etapa fundamental, não apenas para o controle de qualidade do produto, mas também para a promoção de práticas agrícolas sustentáveis e a otimização da eficiência em toda a cadeia produtiva. A análise detalhada dos frutos, que pode abranger parâmetros como teor de sólidos solúveis, acidez titulável, açúcares redutores, compostos fenólicos e conteúdo vitamínico, fornece

subsídios técnicos cruciais para a tomada de decisões mais assertivas no manejo agrícola. Com base nesses dados, os produtores podem ajustar o uso de insumos como água, fertilizantes e defensivos agrícolas de maneira mais racional, promovendo a eficiência no uso dos recursos naturais e a consequente redução de resíduos e impactos ambientais.

No âmbito do processamento industrial, em especial na etapa de extração do suco, a composição dos frutos orienta o controle de variáveis operacionais, como pressão, tempo e temperatura, com o objetivo de maximizar o rendimento da extração e preservar os compostos bioativos e sensoriais responsáveis pelo sabor, aroma, cor e valor nutricional do produto. Além disso, a variabilidade sazonal e regional dos frutos pode ser monitorada por meio dessas análises, permitindo ajustes dinâmicos nas linhas de produção para garantir a padronização e a consistência do suco ao longo do tempo. Dessa forma, a análise composicional se consolida como uma ferramenta estratégica, integrando os elos do campo à indústria e contribuindo para o desenvolvimento de sistemas produtivos mais sustentáveis, eficientes e orientados à qualidade (Tilman *et al.*, 2022).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é realizar uma busca por trabalhos que envolvam o uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear como resposta para importantes problemas relacionados a sucos de laranja, como por exemplo degradação, adulteração, origem geográfica, entre outros.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 RMN

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica, a qual possui muita aplicação para a análise estrutural de moléculas em diversas áreas como a química, bioquímica e ciência dos materiais.

O método consiste na absorção de radiação eletromagnética, a qual sob efeito de um campo magnético, pode levar à absorção de radiação na região de radiofrequência (rf) por núcleos atômicos que possuem momento magnético não nulo (spin diferente de zero) quando inseridos sobre a influência de um campo magnético externo (Silverstein *et al.*, 2005).

Esse fenômeno ocorre devido ao comportamento específico dos núcleos atômicos que possuem um momento magnético nuclear. Este momento não depende da movimentação de cargas elétricas. Essas características estão ligadas por uma constante chamada razão magnetogírica, γ , que é única para cada tipo químico, e é representada pela equação 1 (Claridge, 2016).

$$\mu = \gamma L \quad (\text{Equação 1})$$

O momento angular dos núcleos faz com que eles se comportem como pequenos ímãs que, quando inseridos em um campo magnético estático (B_0), orientam-se preferencialmente a favor do campo em um movimento giratório oscilante, denominado precessão angular, que representa uma condição de equilíbrio térmico. Os spins nucleares alinham-se conforme a direção do campo magnético externo e, nesse campo, o estado degenerado se desdobra em dois níveis de energia: um de menor energia (α) e outro de maior energia (β). Ao irradiar a amostra com ondas de radiofrequência na frequência correta, os núcleos podem absorver essa energia e transitar entre esses estados (Hore, 2015)

A transição entre os estados de energia ocorre pela absorção de energia na faixa de radiofrequência (rf), através da aplicação de uma radiação cuja energia está relacionada à diferença entre os dois estados, conforme a equação 2 (Oliveira, 2012).

$$\Delta E = h\nu = \hbar\omega_0 \quad (\text{Equação 2})$$

Nesta equação, ΔE representa a diferença de energia entre os dois níveis, \hbar é a constante reduzida de Planck, e ω_0 é a frequência de ressonância, também conhecida como frequência de Larmor. A energia absorvida é quantizada e igual à diferença de energia entre os estados, ΔE , sendo diretamente proporcional a B_0 . Assim, quanto maior o campo magnético aplicado, maior será o excesso populacional, o que possibilita a observação da ressonância (Pavia *et al.*, 2015).

A frequência angular de precessão, denominada frequência de Larmor, resulta na formação de um campo elétrico com a mesma frequência, que pode acoplar-se ao campo elétrico da radiação de radiofrequência, permitindo a absorção de energia suficiente para a transição entre estados de spin.

Cada próton em uma molécula pode ressoar em uma frequência específica, determinada pelo seu ambiente eletrônico. Os elétrons ao redor dos núcleos, quando submetidos a um campo magnético externo (B_0), geram campos magnéticos locais que geralmente se opõem a B_0 , resultando na blindagem dos prótons. Em certas situações, efeitos eletrônicos podem reduzir essa blindagem, causando desblindagem. Essas interações influenciam as frequências de absorção observadas, que são distintas para cada tipo de próton.

A quantificação do sinal em RMN de ^1H baseia-se na proporcionalidade entre a área sob um sinal, dada pela integral (I), e o número de prótons (nH) que originam este sinal. Esta relação é expressa pela equação 3:

$$I = KS \times nH \quad (\text{Equação 3})$$

Onde KS é uma constante de proporcionalidade fornecida pelo espectrômetro. Para obter o sinal de RMN, é necessário perturbar a condição de equilíbrio térmico. Isso é realizado aplicando um campo magnético oscilante (B_1), que gera um torque sobre a magnetização, deslocando-a da direção Z (condição de equilíbrio) para o plano $x'y'$. Após o campo B_1 ser desligado, a condição de equilíbrio térmico é restabelecida, com a magnetização retornando à direção Z em um fenômeno conhecido como relaxação. Nessa etapa, quando a magnetização volta a precessionar a favor de B_0 , é feita a aquisição do sinal de RMN. Durante o retorno dos spins nucleares ao estado de equilíbrio térmico, o excesso de energia devido à aplicação de B_1 é dissipado na rede (relaxação longitudinal ou spin-rede) ou ainda pela perda de coerência de fase (relaxação transversal, ou spin-spin).

Os processos de relaxação observados em RMN são denominados relaxação longitudinal (T_1) e relaxação transversal (T_2). A relaxação longitudinal (T_1) está relacionada ao

retorno da magnetização ao equilíbrio térmico, enquanto a relaxação transversal (T_2) refere-se ao desaparecimento do sinal no plano $x'y'$, pela perda de coerência de fase. Ambos os processos de relaxação, quando aplicados à análise de alimentos, são capazes de determinar a proporção de hidrogênio nas fases sólida e líquida de um alimento.

3.1.2 Tipos de equipamentos de RMN

Os espectrômetros de RMN, que são os equipamentos usados para a detectar as ressonâncias feitas e as traduzi-las em um espectro são classificados em duas categorias principais:

- RMN de Alto Campo

Refere-se a espectrômetros que operam com campos magnéticos intensos e bastante homogêneos, sendo tipicamente acima de 200 MHz para núcleos de hidrogênio (^1H). São instrumentos conhecidos por fornecer espectros com alta resolução e sensibilidade, tornando mais recomendados para a análise detalhada de estruturas moleculares complexas e para a detecção de compostos em baixas concentrações. A desvantagem desses equipamentos é seu alto custo, tanto para aquisição quanto para manutenção, pois seus magnetos supercondutores requerem recargas periódicas de líquidos criogênicos de custo alto, em particular o hélio líquido.

- RMN de Médio Campo

Utiliza espectrômetros com campos magnéticos menos intensos, geralmente entre 40 e 100 MHz. Esses instrumentos, geralmente, são mais acessíveis em termos de custo e manutenção, por não requererem o uso de magnetos supercondutores e são adequados para aplicações que não requerem muita resolução. Neste contexto, esses equipamentos são frequentemente empregados em ambientes industriais para controle de qualidade e análise de produtos

3.1.3 RMN em misturas complexas

Neste tipo de amostra a sensibilidade e a resolução são questões importantes para que o maior número de constituintes químicos seja identificado. Quando se tem um espectro de RMN de uma substância pura, seus sinais são atribuídos facilmente, por meio dos seus deslocamentos químicos e pelo acoplamento escalar. Em uma mistura, os sinais de RMN das diferentes

moléculas podem se sobrepor ou se confundir, tornando difícil atribuí-los corretamente a cada componente. Portanto, são necessárias técnicas especializadas na identificação e separação de sinais originados por cada componente da mistura (Oliveira, 2012).

Diversos métodos para resolver essa complexidade, são citados na literatura, como:

- *DOSY (Diffusion-Ordered Spectroscopy)*: permite medir os coeficientes de difusão de moléculas em solução, separando os sinais espectrais com base em suas mobilidades. Ela combina deslocamentos químicos com coeficientes de difusão, resultando em um espectro bidimensional que diferencia compostos em misturas complexas por meio dos coeficientes de difusão. O fato de o método resultar na separação dos sinais das moléculas por meio da diferença da difusão o faz ser conhecido com cromatografia de spins.
- *TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)*: é uma técnica bidimensional que identifica acoplamentos dentro de toda a rede de spins escalarmente acoplados. Utiliza transferência de magnetização para correlacionar prótons interligados, exibindo seus sinais como cruzamentos em um espectro 2D. Com esta técnica, é possível identificar sistemas de spins típicos de determinadas moléculas, como aminoácidos e açúcares, por exemplo.
- *HSQC-TOCSY (Heteronuclear Single Quantum Coherence - Total Correlation Spectroscopy)*: combina elementos do HSQC e TOCSY, permitindo correlacionar núcleos heteronucleares dentro de uma rede de spins conectados. Utiliza transferência de magnetização escalar para mapear toda a rede, resultando em um espectro bidimensional que facilita a identificação de sistemas complexos. Esta técnica também permite identificar os sistemas de spins típicos, mas com uma maior resolução, uma vez que a segunda dimensão trata da janela de carbono-13, muito mais ampla que a do hidrogênio.
- *MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS*: um conjunto de métodos estatísticos e matemáticos, é empregada para processar e interpretar os vastos conjuntos de dados espectrais gerados pela RMN de ^1H . Técnicas quimiométricas, como a Análise de Componentes Principais (PCA), são fundamentais para simplificar a visualização dos dados, permitindo a identificação de padrões, agrupamentos e a distinção entre amostras com características semelhantes, como variedades ou adulterações. A PCA, por exemplo, é um método não supervisionado que projeta o conjunto de dados multivariados em um novo espaço de

menor dimensão, maximizando a variância e revelando tendências de agrupamento ou separação. Além disso, a calibração multivariada, como a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), permite prever as concentrações de compostos com base nos espectros de RMN, associando as variações espectrais às diferenças observadas entre os grupos. Essas abordagens quimiométricas são cruciais para extrair informações relevantes de conjuntos de dados complexos, revelar tendências e aumentar a sensibilidade para detectar compostos mesmo em baixas concentrações.

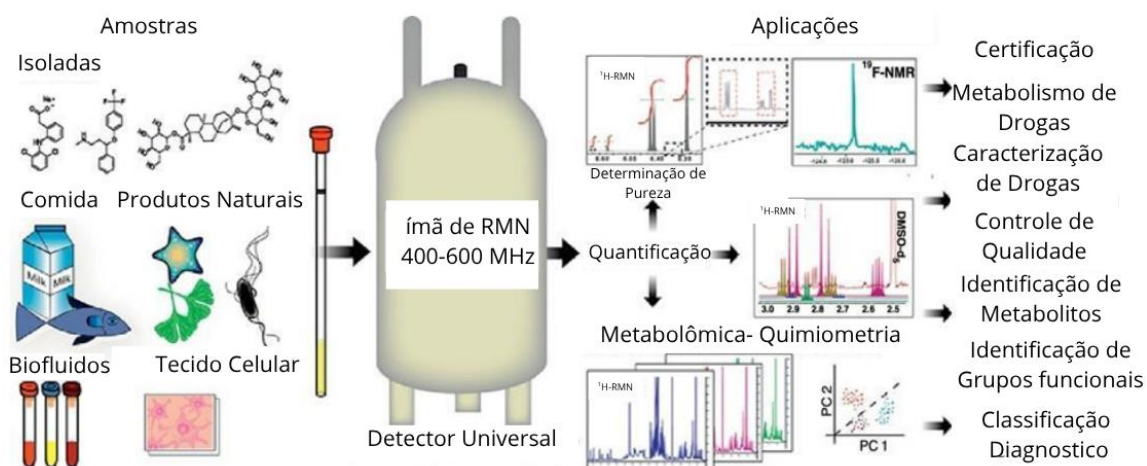
3.2 Análise de suco de frutas por RMN

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica, a qual vem ganhando aplicações recentes e importantes, para além da caracterização estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos, como por exemplo, na quantificação de metabólitos presentes em extratos, tecidos intactos, água, e gordura em alimentos, entre outros sistemas biológicos. Esse tipo de estudo tem como principal abordagem a metabolômica, ou seja, um estudo que prevê a identificação e quantificação do maior número de metabólitos, primários ou secundários, presentes numa amostra.

Mesmo a RMN de médio e baixo campo (Pereira; Meireles; Machado, 2012), tem ganhado destaque, já há muitos anos, e sendo uma importante ferramenta no controle de qualidade na indústria de alimentos. Nos últimos 20 anos, a técnica foi avançando para ser usada na avaliação de danos, características sensoriais e estudos fisiológicos das frutas. Na grande maioria dos estudos, as amostras são analisadas por equipamentos que trabalham no domínio do tempo e usam como parâmetros os tempos de relaxação, em vez de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, só observados em equipamentos com campos magnéticos acima de 40 MHz.

O desenvolvimento contínuo de estudos sobre RMN é motivado por sua habilidade de analisar simultaneamente múltiplos compostos, tornando-a uma ferramenta valiosa para estabelecer o que é conhecido como "*fingerprint*" de amostras de sucos. Esta técnica fornece informações detalhadas dos sucos, destacando-se como um recurso poderoso na caracterização da composição química dele. Além disso, possui inúmeras aplicações em diversas áreas como produtos naturais, alimentos e biolíquidos, conforme pode ser visto na figura 1.

Figura 1 - Diagrama adaptado pela autora, mostrando os tipos de amostras analisadas por diferentes métodos da técnica de RMN, assim como os resultados obtidos por essa técnica

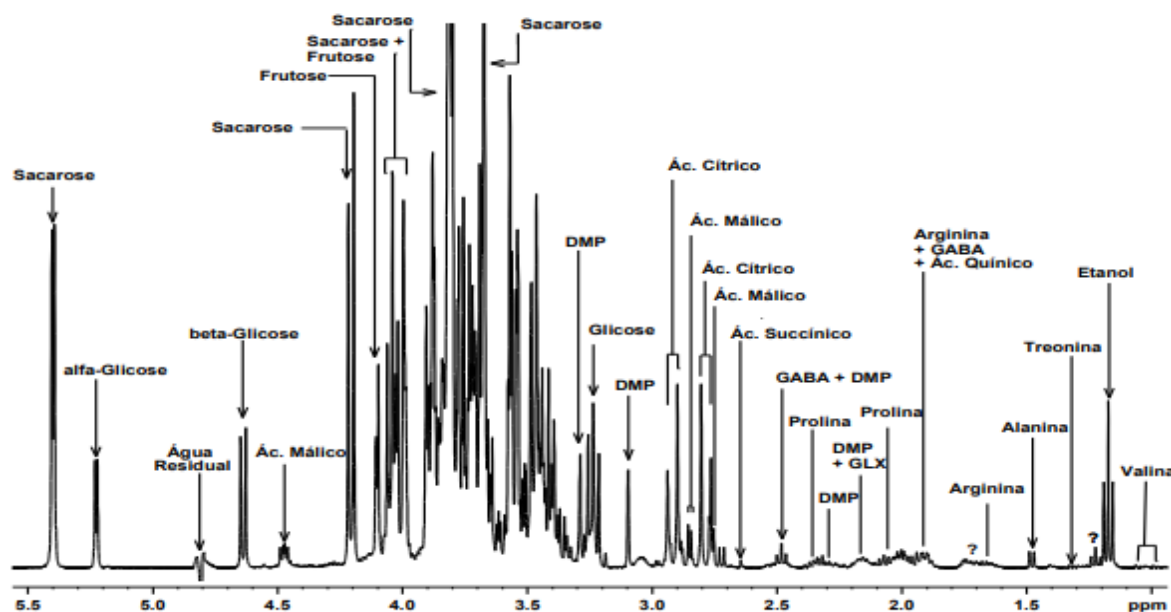


Fonte: Modificado de Simmler *et al.* (2014).

A técnica também possibilita a identificação e quantificação de diversos metabólitos, incluindo açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e compostos fenólicos, e é essa caracterização detalhada que auxilia na compreensão da composição do suco e na detecção de possíveis alterações e/ou adulterações.

Também, há a possibilidade de identificação de metabólitos específicos que surgem, tem sua quantidade aumentada ou diminuída durante o processo de degradação do suco. O estudo de Oliveira *et al.* (2014) demonstra a aplicação da RMN no monitoramento da degradação do suco de laranja fresco armazenado em diferentes temperaturas, identificando o aumento de ácidos orgânicos como indicadores de deterioração, conforme mostra a figura 2.

Figura 2 - Espectro de RMN-1H (400 MHz), mostrando o perfil dos sinais relacionados à degradação do suco de laranja



Fonte: Oliveira *et al.* (2014).

A Figura 2 ilustra o perfil metabólico do suco de laranja, no qual o espectro revela a presença de açúcares (sacarose, frutose, glicose), ácidos orgânicos (cítrico, málico, succínico), aminoácidos e etanol. No contexto do estudo de Oliveira *et al.* (2014), a RMN permitiu observar que as condições de armazenamento por 24 horas levaram à produção de ácidos fórmico, fumárico e acético, além de um aumento nos ácidos succínico e lático e no etanol, que estavam em baixa concentração inicialmente. A combinação da RMN com a quimiometria foi crucial para extrair informações significativas dos espectros complexos, permitindo a identificação de padrões de degradação e a discriminação entre amostras. A presença e o aumento de etanol são fortes indicadores de fermentação alcoólica, um processo de degradação que afeta a qualidade do suco.

Uma vantagem dessa técnica, é que ela é não destrutiva, o que significa que a amostra pode ser utilizada para outras análises após a análise por RMN, além de ter também um preparo da amostra para análise relativamente simples, geralmente envolvendo apenas a centrifugação e filtração do suco.

A técnica apresenta alta reprodutibilidade, fornecendo resultados consistentes e confiáveis. Porém, ainda apresenta algumas desvantagens e limitações, como sensibilidade limitada (em comparação com outras técnicas como a cromatografia e espectrometria de massas), alto custo, complexidade de interpretação e dificuldades com moléculas grandes.

4 REVISÃO

Esta revisão bibliográfica irá apresentar as aplicações mais recentes do uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em diferentes aplicações para quantificação e identificação em suco de laranja (Yu *et al.*, 2025).

4.1 Uso da técnica para identificação de perfis metabólicos

O artigo, de tradução “*Análise metabolômica por RMN de sucos de frutas cítricas da calábria: uma abordagem para avaliar a autenticidade e a origem geográfica*” (Salvino; Colella; De Luca, 2021) usa a técnica de RMN para analisar sucos de frutas cítricas, e os perfis metabólicos para o controle de qualidade, em compostos que influenciam o sabor, a qualidade sensorial e as propriedades nutricionais.

Como metodologia, o artigo investigou três tratamentos industriais distintos para a produção de sucos e concentrados de frutas cítricas. Os processos incluíram extração, pasteurização e concentração. Foram coletadas 32 amostras de material em diferentes fases de fabricação, abrangendo dois processos de concentrado de laranja (A e B) e um de concentrado de laranja e clementina (C). As amostras, provenientes de diferentes lotes e cultivares da Planície de Gioia Tauro, foram congeladas e posteriormente preparadas para análise por RMN. A preparação envolveu descongelamento, centrifugação (com diluição para amostras concentradas) e ajuste do pH para 2,9-3,0, visando padronizar os resultados. As amostras de RMN foram complementadas com D₂O para travamento de frequência, Ácido 3-(trimetilsilil)propiónico (TMSP) para referência interna de deslocamentos químicos e azida de sódio para inibição microbiana.

Com relação a análise por RMN, a metodologia utilizada, se baseou nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C que foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance de 500 MHz. A identificação dos metabólitos foi realizada por meio de experimentos de RMN unidimensionais (1D ¹H e 1D ¹³C-¹H) e bidimensionais (2D), incluindo COSY (Correlação Espectroscópica) e HMQC (Correlação de Múltiplos Quanta Heteronuclear).

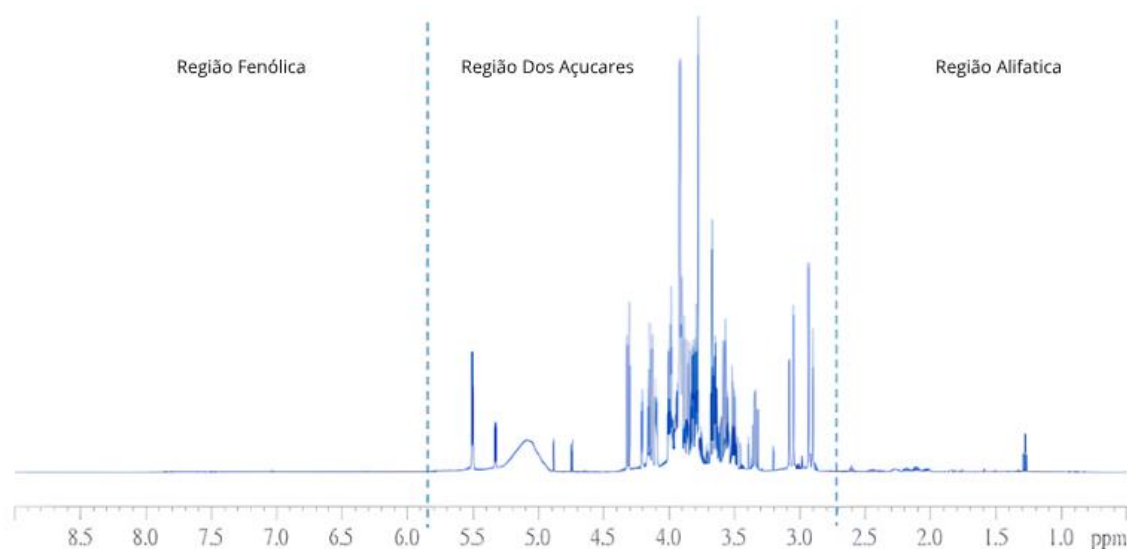
Os experimentos 1D ¹³C-¹H foram configurados com desacoplamento de prótons para otimizar a coleta de dados. Para os espectros de 1D ¹H, foi empregada uma sequência de pré-saturação para eliminar o sinal da água, garantindo a clareza dos sinais dos metabólitos. Os experimentos 2D, COSY e HMQC, que fornecem informações sobre as correlações entre

prótons (COSY) e entre prótons e carbonos (HMQC), também utilizaram pré-saturação para supressão do sinal de água. A atribuição dos metabólitos foi confirmada por comparação com dados de literatura.

Com relação as etapas de processamento e pré-tratamento dos dados de RMN. Nos experimentos 2D (COSY e HMQC), filtros senoidais foram aplicados antes da Transformada de Fourier. Para os espectros 1D, após a Transformada de Fourier, foram realizadas as etapas de faseamento, correção da linha de base e alinhamento, utilizando o sinal de TMSP como referência. Os espectros de $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ foram submetidos a um filtro de alargamento de linha de 1 Hz. Os espectros de ^1H foram segmentados em regiões de 0,05 ppm ("*bucketing*"), com as integrais normalizadas e exportadas para análise estatística. O resultado foi um conjunto de dados com 32 amostras e 69 variáveis, e todo o processamento foi executado no software TopSpin 3.6.

O artigo traz o espectro de RMN de hidrogênio com três regiões espectrais importantes a serem analisadas, como mostrado na figura a seguir. São essas regiões: a alifática (0-3 ppm), os açúcares (3,5-5 ppm) e os compostos fenólicos (6-8 ppm).

Figura 3 - Espectro de RMN- ^1H de uma amostra de suco de laranja, destacando suas principais regiões importantes para serem analisadas.



Fonte : Adaptado pela autora, com base em Salvino; Colella; De Luca, 2021

Dentre as regiões, alguns picos são característicos de certos compostos e foram apresentados na tabela que se encontra a seguir:

Tabela 1 - Valores de deslocamentos químicos (δ) de ^1H e ^{13}C extraídos dos espectros de RMN para principais constituintes do suco.

Composto	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
Valina	0,98 1,03	17,43
Etanol	1,17 3,65	17,50 58,15
Treonina	1,32 4,28	
Alanina	1,48 3,86	16,80
Arginina	1,64 1,91 3,04 3,24	
Ácido Quínico	1,90 2,16 2,79 4,04	
Ácido Gama-Aminobutírico	1,94 2,49 3,04	31,5
Prolina	2,00 2,07 2,34 2,96 3,33 3,39 4,13	25,90
Dimetilfosfato	2,15 3,09 3,36	
Glutamato e Glutamina	2,15 2,27 3,84	
Ácido Málico	2,44 2,74 4,32	
Ácido Cítrico	2,79 2,93	44,22
Astaxantina	2,87 2,95 4,05	
Ácido Succínico	2,65	
β - Frutose	3,81 4,10	
β - Glicose	3,23 3,39 3,48 3,52 3,70 4,63	
α - Glicose	3,47 3,56 3,72 3,77 3,85 5,23	
Sacarose	3,55 3,70 3,72 3,80 3,82 3,88 3,89 4,00 4,04 4,20 5,40	
Tirosina	6,95 7,21	
Fenilalanina	7,32	
Ácido Fórmico	8,22	
Histidina	8,65	
Florina	6,15 6,22	

Fonte: Adaptada pela autora (2025).

Os resultados obtidos, foram separados em 3 grupos principais, que compõe a caracterização do perfil metabólico da laranja, para uma melhor discussão:

- **Composição de Açúcares:**

O suco de laranja apresentou concentrações altas de glicose e frutose, que são os açúcares responsáveis pela doçura da fruta, com destaque para sacarose, que em especial foi encontrada em níveis significativos, contribuindo para o equilíbrio do sabor, além de ser importante para a aceitação do produto pelos consumidores.

Como resultado em específico, o estudo mostrou que as laranjas cultivadas na Calábria tendem a ter um alto teor de açúcares, o que resulta em sucos com um sabor mais doce, sendo geralmente preferido pelos consumidores.

- **Ácidos Orgânicos:**

Dentre os principais ácidos da laranja, o ácido cítrico é o que influencia o sabor. O estudo encontrou que o ácido cítrico foi o principal composto encontrado nos sucos de laranja, e teve a sua concentração variando dependendo do lote e do método de processamento.

Já o ácido málico foi encontrado em concentrações menores, mas também contribui para a acidez, sendo outro fator a ser monitorado para garantir a qualidade do suco.

- Flavonoides e Compostos Bioativos:

O estudo observou uma boa quantidade de flavonoides no suco de laranja, que são os compostos com propriedades antioxidantes, que não apenas melhoram o valor nutricional do suco, mas também influenciam a percepção de sabor e frescor.

Os compostos como hesperidina e rutina foram identificados.

Além desses dados, o estudo também observou que os perfis metabólicos dos sucos de laranja podem variar com base em diferentes fatores, que podem ser observados a seguir:

- Maturação das Frutas: Laranjas colhidas mais cedo na temporada apresentaram menor quantidade de açúcares e maior concentração de ácido cítrico, resultando em um suco mais ácido e menos doce. Já as laranjas mais maduras mostraram uma maior concentração de açúcares e um perfil mais doce.
- Efeito das Condições Climáticas: As variações nas condições climáticas de cultivo influenciaram a composição do suco. Durante anos mais quentes, as laranjas apresentaram uma menor acidez e um aumento na concentração de açúcares, o que alterou o equilíbrio de sabor.

Por fim, como conclusões deste tipo de estudo, pode-se observar que os resultados mostraram que a metabolômica por RMN é uma ferramenta extremamente útil para o controle de qualidade na produção industrial de sucos de laranja.

Através da técnica, foi possível identificar variações críticas nos perfis metabólicos, como concentrações de açúcares e ácidos, que afetam diretamente o sabor e a aceitação do produto.

Além disso, a detecção precoce de problemas no processo de produção, como falhas no processamento ou variações na matéria-prima, ajudou a ajustar rapidamente o processo, garantindo que o suco de laranja da Calábria atendesse consistentemente aos padrões desejados de qualidade. A utilização de RMN também ofereceu uma maneira mais eficiente e objetiva de monitorar a qualidade em larga escala, melhorando a consistência e a confiabilidade do produto.

4.2 Uso de identificação de origem geográfica

O artigo, de tradução “*Análise quantitativa de componentes baseada em RMN e identificação da origem geográfica da laranja doce na China*” (Lin *et al.*, 2021) utilizou a técnica de Ressonância Magnética Nuclear para realizar uma análise quantitativa dos componentes e identificar a origem geográfica das laranjas doces da China. O estudo combinou técnicas de metabolômica com análise de dados para separar e verificar a autenticidade geográfica das laranjas.

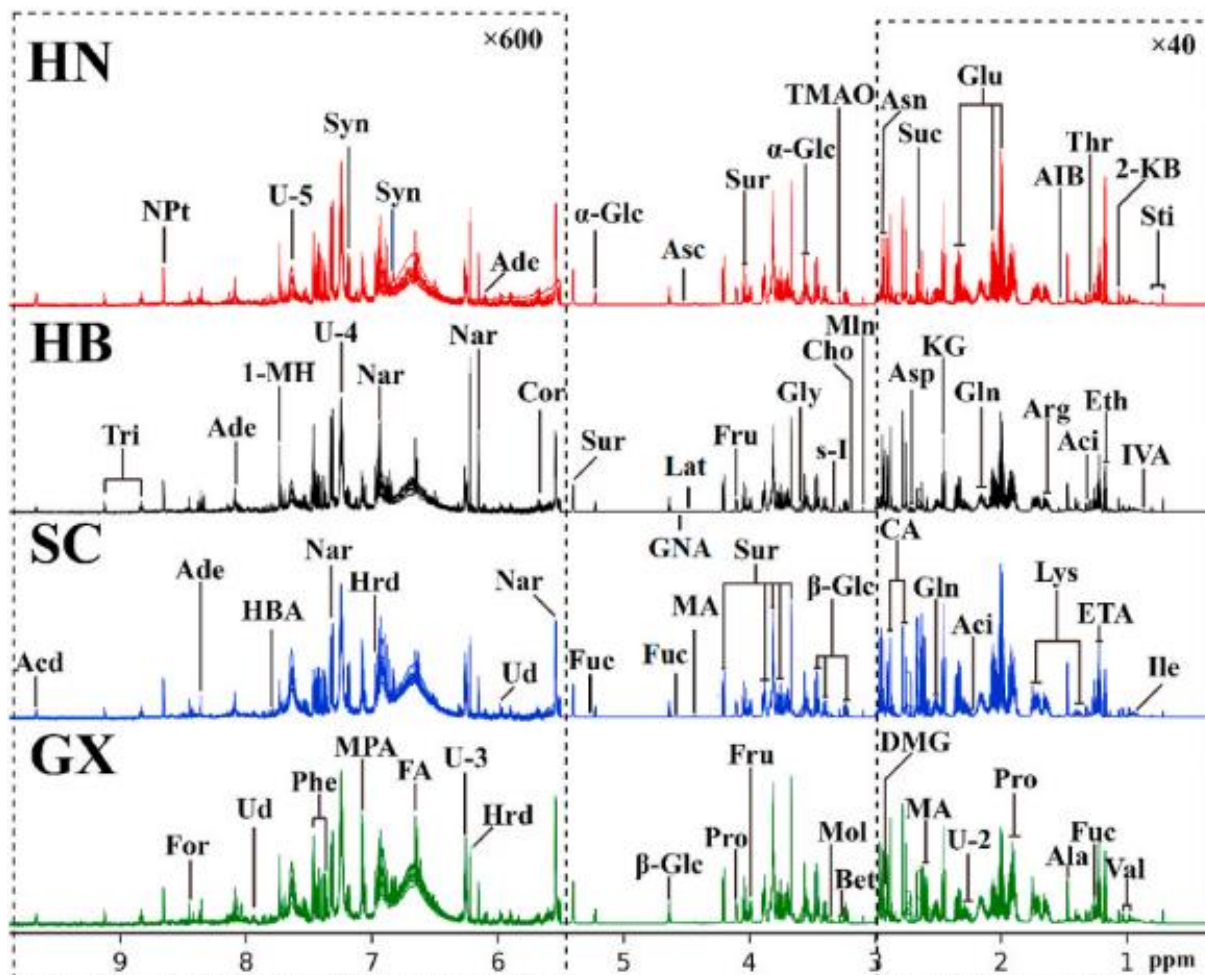
Como metodologia, a preparação de amostras, ocorreu de maneira que as laranjas de quatro regiões produtoras chinesas foram adquiridas em abril de 2019, e após lavagem, secagem e armazenamento, as laranjas foram espremidas. O suco obtido foi centrifugado, e o sobrenadante foi misturado com uma solução tampão de fosfato deuterado (TSP), que é um padrão de referência. Após uma segunda centrifugação, o sobrenadante final foi transferido para tubos de RMN para a aquisição dos espectros.

Já a análise por RMN, os experimentos foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III de 600 MHz, utilizando a sequência de pulsos ZGPR e parâmetros específicos de aquisição. Para confirmar a identificação dos sinais, foram também adquiridos diversos espectros de RMN 2D (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC e J-resolvido) em uma amostra selecionada.

O pré-processamento dos dados foi feito com o software MestReNova, incluindo Transformada de Fourier, ajuste de fase, correção de linha de base e calibração. Os FIDs foram multiplicados por uma função de janela para melhorar a relação sinal-ruído, e o espectro foi referenciado ao TSP em δ 0,0. As regiões espectrais de interesse foram integradas automaticamente, excluindo-se as regiões da linha de base e os picos de água residuais para evitar interferências na análise estatística. Por fim, os dados integrados foram normalizados pela soma total do espectro.

A figura 4 apresenta espectros de RMN de amostras de sucos de laranja de diferentes regiões geográficas, com destaque a três regiões espectrais de interesse, aminoácidos, açúcares e substâncias aromáticas, com tratamento diferenciado para cada uma das regiões espectrais.

Figura 4 - Espectros de RMN-¹H para as diferentes regiões de estudo, sendo HN, Hunan; HB, Hubei; SC, Sichuan; GX, Guangxi.



Fonte: Lin et al., 2021

Visando uma discussão mais clara, o estudo separou os resultados em 3 principais, como será descrito a seguir.

4.2.1 Composição Quantitativa dos Compostos

- Açúcares:

O estudo trouxe que a análise de RMN revelou que os açúcares principais encontrados no suco de laranja doce foram sacarose, glicose e frutose, podendo ser visto com mais detalhes a seguir:

Sacarose: foi identificada como o açúcar predominante, com concentrações variando entre 97,75 a 131,93 mM nos sucos de laranja.

Glicose e frutose: foram identificadas concentrações menores, variando entre 24,63 a 35,37 mM para frutose e 30,15 a 62,51 mM para Glicose.

A concentração de glicose foi observada como mais variável entre as amostras de diferentes regiões. Em algumas áreas, como Hunan, foi encontrada em maiores concentrações, enquanto em outras, como Guangxi, foi mais baixa.

- **Ácidos Orgânicos:**

Ácido cítrico: foi o composto ácido predominante nos sucos, com concentrações variando de 26,40 a 41,99 mM.

Ácido málico: foi encontrado em menores concentrações (3,19 a 7,70 mM), mas ainda assim contribuindo para o perfil de acidez.

Já a proporção entre ácido cítrico e ácido málico variou de acordo com a região. Em áreas como Hunan, onde o clima é mais temperado, o ácido cítrico foi predominante, proporcionando um sabor mais ácido. Já em áreas mais quentes, como Guangxi, a concentração de ácido málico foi maior, dando ao suco um sabor mais suave e menos ácido.

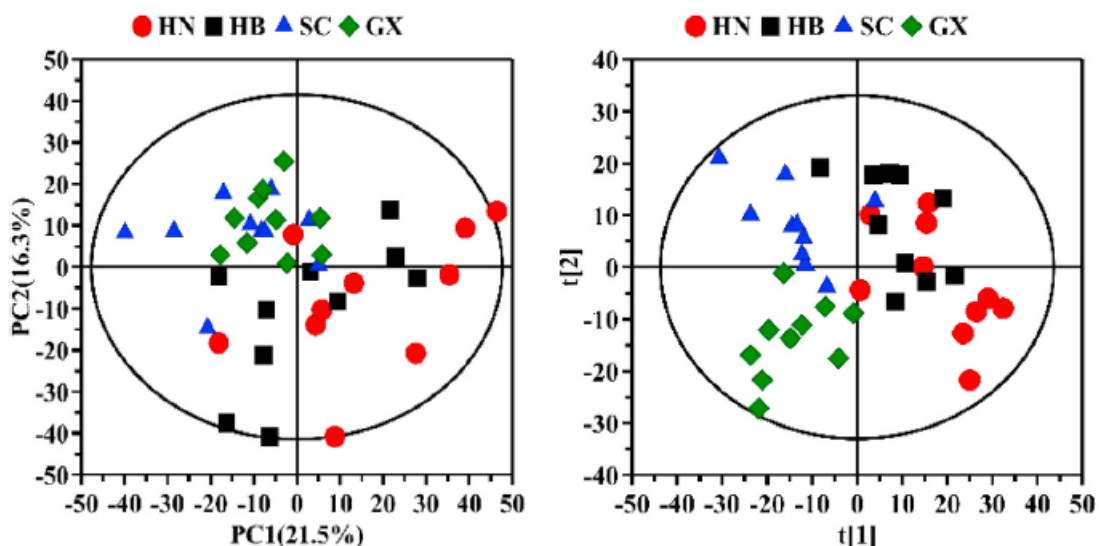
- **Flavonoides e Compostos Bioativos:**

Hesperidina: foi identificado em quantidades significativas em todas as amostras, com concentrações variando de 0,08 a 0,22 mM.

4.2.2 Identificação da Origem Geográfica das Laranjas

A técnica de PCA foi utilizada para discriminar as amostras de sucos das diferentes regiões da China com base nos seus perfis metabólicos. E a imagem do seu gráfico de componentes principais pode ser visto a seguir:

Figura 5 - Gráficos das componentes principais (PC1xPC2), à esquerda, e PLS-DA a direita das laranjas doces em diferentes áreas de produção, sendo: HN, Hunan; HB, Hubei; SC, Sichuan; GX, Guangxi.



Fonte: Lin et al., 2021

Para os dados de PCA, a análise revelou uma tendência de separação dos perfis metabólicos, evidenciada pelas distinções observadas. No entanto, as áreas SC e GX permaneceram agrupadas no centro, sugerindo uma certa similaridade entre elas. Dessa forma, é necessário adotar a técnica de PLS-DA (Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais), onde se busca maximizar a covariância entre os dados metabólicos e as regiões, e dessa forma sim, percebe-se a separação clara dos perfis entre as regiões.

Buscando então, uma melhor discriminação por perfis, utilizou-se a técnica de OPLS-DA, (análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais), aplicada aos dados de RMN das amostras de suco de laranja provenientes de diferentes regiões produtoras da China, demonstrou alto poder de diferenciação dos perfis metabólicos entre os grupos avaliados. Nos painéis da Figura 7, observa-se a separação clara das amostras de Hunan (HN), Hubei (HB), Sichuan (SC) e Guangxi (GX) em relação às amostras de outras localidades (Others), evidenciando a influência da origem geográfica na composição química do suco.

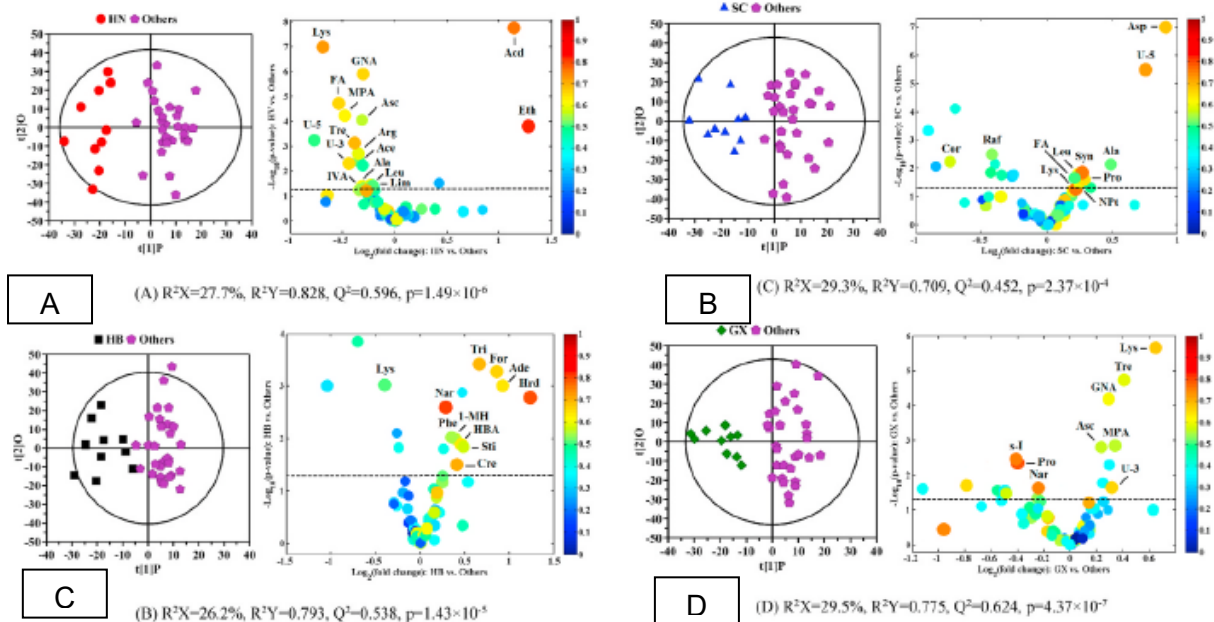
Para a região de Hunan (painel A), o modelo apresentou excelente qualidade, com $R^2Y = 0,828$ e $Q^2 = 0,596$ ($p = 1,49 \times 10^{-6}$), indicando que as variáveis metabólicas são altamente explicativas e preditivas na separação das amostras. O gráfico do tipo *volcano plot* destacou compostos como lisina (Lys), ácido fórmico (FA), ácido acético (Ace), etanol (Eth) e ácido cítrico (Acd) como marcadores químicos diferenciais para esta região.

No caso de Hubei (painel B), também foi observada uma separação significativa, com $R^2Y = 0,793$ e $Q^2 = 0,538$ ($p = 1,43 \times 10^{-5}$). Compostos como tirosina (Tyr), ácido hidroxibutírico (HBA), Naringina (Nan), foram identificados como metabólitos com variações estatisticamente significativas, reforçando a possibilidade de uso desses marcadores na caracterização da origem.

As amostras de Sichuan (painel C) apresentaram uma separação menos acentuada, com $R^2Y = 0,709$ e $Q^2 = 0,452$ ($p = 2,37 \times 10^{-4}$), embora ainda estatisticamente significativa. Compostos como ácido aspártico (Asp), alanina (Ala) e ácidos graxos (FA) contribuíram para a diferenciação, o que indica a presença de um perfil metabólico regional, mesmo que parcialmente sobreposto às demais regiões.

Por fim, para a região de Guangxi (painel D), o modelo se mostrou bastante robusto, com $R^2Y = 0,775$ e $Q^2 = 0,624$ ($p = 4,37 \times 10^{-7}$). Os principais metabólitos responsáveis pela diferenciação incluem treonina (Tre), prolina (Pro).

Figura 6 - Gráfico de pontuações OPLS-DA



Fonte: Lin et al., 2021

Com base nas imagens 5 e 6, foi possível obter os seguintes resultados:

- **Discriminação Regional:**

As laranjas de diferentes províncias da China apresentaram assinaturas metabólicas distintas, permitindo que o estudo diferenciasse com precisão as origens geográficas. Por exemplo, as laranjas de Hunan mostraram concentrações mais elevadas de limonina e sacarose, características de um perfil aromático mais fresco e amargo.

Enquanto isso, as laranjas de Guangxi, apresentaram um perfil mais ácido com maiores concentrações de ácido cítrico e menores de limonina, refletindo um sabor mais ácido. Isso foi confirmado pela análise PCA, que separou claramente as amostras de Hunan das de outras regiões.

- **Impacto de Fatores Climáticos e de Cultivo:**

As variações nos perfis metabólicos foram influenciadas por fatores climáticos e de cultivo, como temperatura, umidade e tipo de solo. Regiões com climas mais temperados, como Hunan, favorecem a produção de laranjas com maior acidez (mais ácido cítrico), enquanto regiões mais quentes, como Guangxi, favorecem laranjas com maior concentração de açúcares e ácido málico, proporcionando sucos mais doces e suaves.

As diferenças no pH do solo também foram associadas a variações nos perfis de compostos como flavonoides, com Hesperidina variando conforme o tipo de solo e as condições de cultivo.

Utilizando a técnica de PCA, foi possível discriminar claramente as amostras de laranja com base na sua origem geográfica. As assinaturas metabólicas variaram significativamente entre as diferentes regiões da China, sugerindo que o perfil metabólico das laranjas pode ser utilizado para identificar sua origem geográfica. Regiões como Sichuan e Hunan apresentaram perfis metabólicos distintos, com diferenças notáveis na concentração de certos compostos, como ácidos orgânicos e flavonoides, que são influenciados por fatores ambientais, como clima e condições de cultivo. Isso demonstra que a composição metabólica das laranjas pode ser um marcador confiável para identificar a região de produção.

A discriminação entre as origens geográficas foi possível devido às variações na concentração de compostos voláteis e outros biomarcadores, como os flavonoides, que podem ser afetados por fatores como a temperatura, a umidade e o tipo de solo nas diferentes regiões de cultivo.

4.2.3 Implicações para Controle de Qualidade e Autenticidade

A análise de RMN foi bem-sucedida em identificar a origem geográfica das laranjas com base em suas características metabólicas únicas. Isso tem implicações diretas para o controle de qualidade, pois pode garantir que o suco de laranja comercializado tenha a autenticidade geográfica correta, isso porque pode ajudar a prevenir fraudes e falsificações em que laranjas de uma região podem ser misturadas com outras de regiões diferentes, comprometendo a autenticidade do produto. Ao verificar os perfis metabólicos, é possível confirmar que o suco provém da região indicada no rótulo.

Rastreabilidade: O estudo destaca a importância da rastreabilidade, especialmente em mercados internacionais, onde os consumidores valorizam a autenticidade e a origem geográfica dos produtos alimentícios. A capacidade de monitorar a qualidade e garantir a origem genuína de laranjas pode também ser vantajosa para os produtores que desejam garantir uma certificação de origem para seus produtos.

Por fim, como conclusões, o estudo demonstrou que a metabolômica por RMN é uma ferramenta eficaz para analisar a composição quantitativa e identificar a origem geográfica das laranjas doces da China. As conclusões principais são:

- A técnica de RMN forneceu dados valiosos para a quantificação precisa de compostos, como açúcares, ácidos orgânicos e compostos voláteis, fundamentais para o perfil sensorial do suco de laranja.
- A análise permitiu discriminar de maneira eficaz as origens geográficas das laranjas com base nas variações nos seus perfis metabólicos, proporcionando uma maneira confiável de identificar a procedência das frutas.
- A combinação de metabolômica com quimiometria oferece uma solução robusta para a certificação de autenticidade e o controle de qualidade do suco de laranja, assegurando que os consumidores recebam produtos autênticos e de alta qualidade.

4.3 Uso de identificação para Adulteração

O artigo, de tradução “Uso de RMN de ^1H para detectar o percentual de sucos de frutas puros em misturas” (Marchetti *et al.*, 2019) estuda o uso da Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN) como uma técnica eficaz para detectar a porcentagem de sucos de frutas puros em misturas de sucos. A técnica de RMN foi aplicada para quantificar a proporção de sucos de frutas em blends comerciais, ajudando a avaliar a qualidade e a autenticidade dos produtos.

Como metodologia, foram adquiridos quatro tipos de sucos de frutas (maçã, laranja, abacaxi e romã) de uma única marca. Para a preparação das amostras, cada suco foi primeiramente centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos para remover todo o material em suspensão. Subsequentemente, para a análise de RMN, diferentes sucos foram misturados nas proporções indicadas pelo planejamento experimental de composição central (CCD), que é um tipo de delineamento fatorial.

Para ácidos orgânicos, aminoácidos e cada composto cuja ionização muda dependendo do pH, o deslocamento químico varia correspondentemente. Essas variações espectrais podem afetar ou invalidar os resultados da análise multivariada, cujo princípio básico é que os sinais correspondentes em diferentes amostras devem ter o mesmo deslocamento químico. Para minimizar os deslocamentos, o pH das amostras com uma solução tamponada foi padronizado. A 9 ml de cada mistura, 1 ml de KH_2PO_4 1 M foi adicionado e o pH foi medido; eventualmente, foi ajustado para 3.1-3.2 usando pequenas quantidades de HCl 1 M. Uma alíquota de 630 μL desta mistura tamponada foi então adicionada a 70 μL de 13 mM de um sal de uma solução tampão de fosfato deuterado sódio (TSP) e 0,1% de azida de sódio em 99,9% de óxido de deutério (D_2O). O TSP foi empregado para referência interna dos deslocamentos químicos de H, enquanto a azida de sódio como agente conservante. A solução final (700 μL) foi transferida para um tubo de RMN WILMAD®, 5 mm, grau Ultra-Imperial, L. 7 pol., 528-PP, adquirido da Sigma-Aldrich (Milão, Itália). Todos os produtos químicos e solventes eram de grau analítico e foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

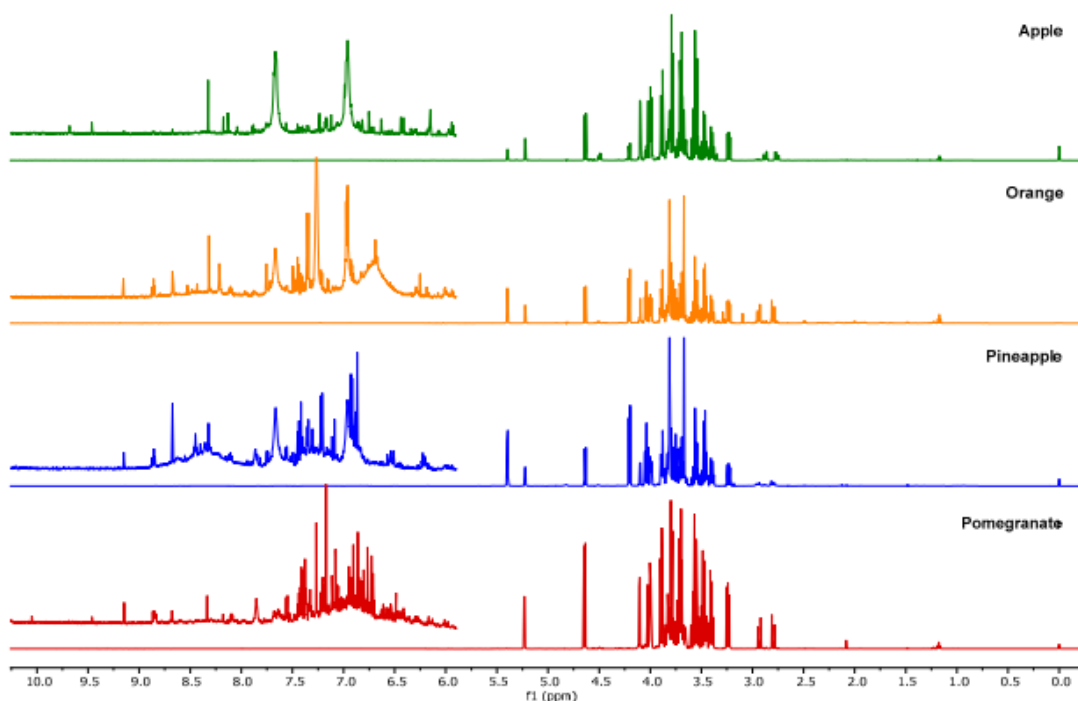
A análise por RMN, contou com espectros de RMN de ^1H unidimensionais de misturas de suco foram adquiridos com um espectrômetro Bruker FT-NMR Avance III HD de 600 MHz (Ettlingen, Alemanha), e todos os experimentos de RMN foram realizados a 300 °K. Após 10 minutos de equilíbrio térmico dentro da sonda, o solvente (D_2O) foi travado para garantir a máxima sensibilidade, a sonda foi ajustada e casada manualmente, e o pulso de 90° foi

calibrado; subsequentemente, o nível de potência para pré-saturação foi calculado, e finalmente o ganho do receptor foi ajustado automaticamente. Experimentos ID NOESY foram adquiridos usando a sequência de pulsos Bruker "NOESY " a fim de suprimir o sinal da água. A frequência de pré-saturação foi ajustada para cada amostra antes da aquisição. Os parâmetros de aquisição foram os seguintes: domínio do tempo (número de pontos de dados), 64 K; varreduras fictícias, 0; número de varreduras, 32; tempo de aquisição, 3,90 s; tempo de atraso, 8 s; largura espectral, 14 ppm (8403,4 Hz), resolução FID, 0,2564 Hz; modo de digitalização, baseopt, tempo total de aquisição, 6 min 22 s.

A técnica foi testada em sucos de várias frutas, como Maçã, Laranja, Abacaxi e Romã, para avaliar sua eficácia na detecção da diluição e de fraudes em sucos misturados.

O resultado do espectro obtido pode ser visto a seguir na figura 8:

Figura 7 - Espectros de RMN-1H para sucos (puros) de diferentes frutas: maçã (em verde), laranja (em laranja) abacaxi (em azul) e romã (em vermelho).



Fonte: Marchetti et al., 2019

Os resultados podem ser separados em 3 tópicos, como será descrito adiante.

4.3.1 Detecção de Fraudes e Adultrações

A RMN ^1H foi particularmente eficaz na detecção de fraudes e adultrações. Mesmo em amostras onde a quantidade de suco puro foi diluída com água ou outros aditivos, a técnica conseguiu identificar diferenças claras nas concentrações de compostos característicos.

Por exemplo, quando suco de laranja puro foi diluído com 50% de água, a análise de RMN conseguiu detectar uma redução significativa nos picos de sacarose e ácido cítrico. Esse tipo de adultração foi facilmente detectado, destacando a capacidade da RMN de identificar variações na composição química do suco.

4.3.2 Comparação com Métodos Convencionais

Quando comparada com métodos tradicionais de análise de sucos, como refratometria e titulação de ácido, a RMN mostrou maior sensibilidade e precisão, especialmente para detecção de baixos níveis de suco puro nas misturas. A técnica não exigiu pré-processamento complexo das amostras e produziu resultados em um tempo relativamente curto.

4.3.3 Sucos de Diferentes Tipos de Frutas

A técnica também foi aplicada em diferentes tipos de sucos de frutas, como laranja, maçã e uva. Em cada caso, os compostos característicos (como sacarose para laranja e frutose para maçã,) foram usados para a quantificação do suco puro. Os resultados indicaram que a RMN é versátil e pode ser aplicada em uma variedade de sucos de frutas com sucesso.

Por fim, como conclusão temos que, os resultados demonstraram que a técnica de RMN- ^1H é uma ferramenta eficiente e precisa para detectar e quantificar a porcentagem de sucos puros em misturas. A RMN apresentou vantagens significativas em termos de precisão, sensibilidade e rapidez em comparação com métodos tradicionais. Além disso, a técnica provou ser particularmente útil para a detecção de fraudes e adultrações em sucos comerciais, oferecendo uma forma eficaz de garantir a autenticidade e a qualidade dos produtos no mercado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desta revisão bibliográfica, foi possível constatar a relevância crescente da técnica de (RMN) como ferramenta analítica para a caracterização de sucos de laranja, especialmente no que se refere à sua composição química, autenticidade e controle de qualidade. A aplicação da RMN, tanto em alto quanto em médio campo, demonstrou-se eficaz na identificação de açúcares, ácidos orgânicos, compostos bioativos e perfis metabólicos específicos, fornecendo subsídios técnicos relevantes para a indústria de alimentos.

Os estudos avaliados demonstraram que a metabolômica baseada em RMN permite não apenas detectar adulterações, mas também discriminar a origem geográfica das amostras de suco, promovendo rastreabilidade e segurança para o consumidor. Além disso, a combinação da RMN com ferramentas quimiométricas ampliou significativamente sua capacidade de análise, tornando-a uma alternativa promissora frente às técnicas convencionais.

Dessa forma, concluiu-se que a RMN representa uma abordagem robusta, não destrutiva e altamente informativa para a análise de sucos cítricos. O avanço na aplicação desta técnica pode beneficiar diretamente o setor produtivo, desde o monitoramento da matéria-prima até a garantia de conformidade com padrões regulatórios. Como sugestão para trabalhos futuros, destaca-se a importância do desenvolvimento de bancos de dados metabólicos regionais e a validação de métodos analíticos padronizados que integrem RMN e modelagem estatística, ampliando ainda mais seu potencial de aplicação na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSANEZI, R. B. et al. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 1-10, 2011.
- BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7-37, 2006.
- BRASIL. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 jun. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 37, de 1º de outubro de 2018**. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para sucos e polpas de frutas. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 08 out. 2018.
- CITRUSBR. Exportações. CitrusBR, 2025. Disponível em: <https://citrusbr.com/estatisticas/exportacoes/>. Acesso em: 14 mar. 2025.
- CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Elsevier, 2016.
- COLQUHOUN, I. J.; RINGWOOD, F.; WILSON, J. C. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy for the analysis of liquid foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 1816-1821, 1997.
- FAO. FAOSTAT: Food and Agriculture Data. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/>. Acesso em: 13 jun. 2025.
- FIGUEIREDO, P.; SOUZA, M.; CAIXETA-FILHO, J. V. The Brazilian citrus chain. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 15, n. 4, p. 1-22, 2012.
- GOTTWALD, T. R. et al. Huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 8, n. 1, p. 31, 2007.
- HORE, P. J. **Nuclear Magnetic Resonance**. Oxford University Press, 2015.
- HULME, A. C. The Biochemistry of the Citrus Fruits. In: Landaniya M (Org). Citrus Fruits: Biology and Technology. 1 ed. Academic Press. 1959.
- IPCC. Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2021. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

LEE, J. Citrus: A Global Perspective. In: Landaniya M (Org). **Citrus: A Complete Guide to Growing, Using, and Preserving Citrus**. 1 ed. Timber Press, 2015.

LIN, H. et al. NMR-based quantitative component analysis and geographical origin identification of China's sweet orange. **Food Control**, v. 130, p. 108292, 2021.

MARCHETTI, L. et al. Use of ¹H NMR to detect the percentage of pure fruit juices in blends. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2592, 2019.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; CONCEIÇÃO, S. V. **The orange juice business: a Brazilian perspective**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2010.

NICOLÁS, C., et al. Origin and Distribution of Citrus. In: Landaniya M (Org). **Citrus: Biology, Technology and Evaluation**. 1 ed. Nova Science Publishers, 2014.

OLIVEIRA, C. R. **Emprego da RMN aliada à quimiometria no controle de qualidade de suco de laranja**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2015.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A.; MACHADO, N. T. Authentication of orange juice using advanced analytical techniques. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p.1875-1881, 2012.

RODRIGUES, E. J.; ALMEIDA, P. P.; FERREIRA, A. P. Innovative approaches in the analysis of citrus juices. **Food Research International**, v. 111, p. 1-10, 2018.

SALVINO, R. A.; COLELLA, M. F.; DE LUCA, G. NMR-based metabolomics analysis of Calabrian citrus fruit juices and its application to industrial process quality control. **Food Control**, v. 121, p. 107619, 2021.

SILVA, L. M.; SANTOS, J. R.; COSTA, L. M. Chemical characterization and quality control of orange juices. **Journal of Food Quality**, v. 38, n. 4, p. 229-237, 2015.

SILVERSTEIN, Robert M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

SIMMLER C. et al. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 25, p.51-59, 2014.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-677, 2002.

YU, K. et al. Advances in computer vision and spectroscopy techniques for non-destructive quality assessment of citrus fruits: a comprehensive review. **Foods**, v. 14, n. 3, p. 386, 2025.