



Faculdade de Farmácia
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado em Controlo de Qualidade

Avaliação da autenticidade de derivados de marmelo
através do perfil fenólico

Branca Maria Cardoso Monteiro da Silva

PORTO
1999



Faculdade de Farmácia
UNIVERSIDADE DO PORTO

Mestrado em Controlo de Qualidade

Avaliação da autenticidade de derivados de marmelo
através do perfil fenólico

Branca Maria Cardoso Monteiro da Silva

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 03/09/20
Reg. 1526
Cota

FFA
SIL
1526

PORTO

1999

*Dissertação de candidatura ao grau
de Mestre em Controlo de Qualidade
na área da especialidade Água e
Alimentos, apresentada à Faculdade
de Farmácia da Universidade do
Porto*

Aos meus Pais

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacognosia da
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Orientadora:

Prof. Aux. Paula Branquinho Andrade

Co-orientadoras:

Prof. Assoc. Rosa Maria Seabra

Prof. Cat. Margarida Alice Ferreira

Indicam-se de seguida as publicações e comunicações que contêm resultados incluídos neste trabalho:

Publicações

- Andrade, P. B., Silva, B. M., Carvalho, A. R. F., Seabra, R. M., Ferreira, M. A. - “Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of sodium benzoate and phenolic compounds in quince jam”, *J. Liquid Chromatogr. and Rel. Technol.* 1999, 22 (7), 1069-1075.
- Silva, B. M., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Oliveira, M. B., Ferreira, M. A. - “Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão”, *Ciencia y Tecnologia Alimentaria* (em publicação).
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Mendes, G. C., Valentão, P., Seabra, R. M., Ferreira, M. A. - “Phenolic compounds analysis in the evaluation of commercial quince jams authenticity”, *J. Agric. Food Chem.* (submetido para publicação).
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Mendes, G. C., Seabra, R. M., Ferreira, M. A. - “Phenolic profile in the evaluation of quince jellies genuineness”, *Z Lebensm Unters Forsch A* (submetido para publicação).
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Oliveira, M. B., Ferreira, M. A. - “Marcadores químicos de genuinidade de derivados de frutos: perfil de compostos fenólicos”, *Revista Portuguesa de Farmácia* (submetido para publicação).
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Oliveira, M. B., Ferreira, M. A. - “Verificação da autenticidade de sumos de laranja – compilação da literatura”, *Revista da Alimentação Humana* (submetido para publicação).

Comunicações

- Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Ferreira, M. A. - “Avaliação da autenticidade de marmeladas através do perfil fenólico”. Comunicação oral. *XII Encontro Luso-Galego de Química*. 11-13 de Novembro de 1998. Exponor (Matosinhos).
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Ferreira, M. A. – “Phenolic compounds analysis in the evaluation of commercial quince jams authenticity”. Painel. *RequiMte*. 5 e 6 de Fevereiro de 1999. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (Porto).

“A história de Portugal é rica em saborosos episódios exemplificadores da gulodice de personagens ilustres. As conventuais marmeladas acompanharam durante séculos, os melhores e os piores momentos da Portugalidade. As estatísticas de Lisboa atribuídas a João Brandão de Buarcos e datadas de 1552 mencionam a existência na capital de 30 confeitores estabelecidos, afora 58 mulheres produzindo marmeladas e açúcares rosados. As contas da tesouraria-mor de Ceuta registam para os anos de 1640 a 1671 gastos de 135 arrobas e 15 arratéis de marmelada. Os fidalgos portugueses foram sempre muito amigos de guloseimas – observa Gustavo de Mattos Sequeira, em cuja obra «Depois do Terramoto» respigámos a maior parte das informações contidas neste escrito. Justifica o investigador, numa tentativa de arqueologia do doce em Portugal, com vários exemplos deliciosos: «Dizia o Coito, gracioso de D. Sebastião, que provava ser fidalgo porque mentia, não pagava a ninguém e era amigo do doce (...) D. Lucas de Portugal, o espirituoso mestre-sala de D. Pedro II declarava também que sempre rezava pela alma de quem inventara coche, comédias, doce e senhoria. O quarto conde de Val de Reis, Nuno Manuel de Mendonça, era conhecido pela alcunha de Marmelada, em razão, talvez, da sua predilecção por esta especialidade nacional tanto do gosto dos cortesãos freiráticos como dos fidalgos aventureiros e batalhadores. D. Lourenço de Almeida, o valente filho do primeiro vice-rei da Índia, entremeava as cutiladas com que apavorava os rumes com o saborear de um ladrilho de marmelada.» Torna-se assim legítimo concluir, sem grande abuso, que a marmelada contribuiu, quiçá de forma decisiva, para a dilatação da fé e do império. No tocante à fé, Mattos Sequeira aponta ainda outro exemplo, colhido no Mapa de Portugal do abade João Baptista de Castro: «Na procissão da Penitência iam sempre 10 ou 12 homens conduzindo caixas de marmelada que os fidalgos devotos ofereciam aos penitentes que se disciplinavam e feriam.»”

em “Expresso, 18 de Março de 1989” (Gonçalves *et al.*, 1991)

Agradecimentos

À Professora Doutora Paula Branquinho Andrade, pela orientação desta dissertação, pela sua capacidade científica e de resolução de problemas, pela sua energia contagiante, pelo incitamento constante e, ainda, pela sua amizade.

À Professora Doutora Rosa Maria Seabra, co-orientadora desta dissertação, pelo acolhimento e disponibilidade das condições materiais indispensáveis ao desenvolvimento do trabalho experimental e, ainda, pelas suas valiosas sugestões.

À Professora Doutora Margarida Alice Ferreira, co-orientadora desta dissertação, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pela sugestão do tema da dissertação que se apresenta.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Bastos, coordenadora do Mestrado em Controlo de Qualidade, pelos seus ensinamentos e a pela sua compreensão.

À Professora Doutora Maria Beatriz Oliveira, por toda a colaboração e disponibilidade prestadas e, ainda, pelo incentivo nos momentos de desânimo.

À Dr.^a Patrícia Valentão, a cujos conhecimentos recorri frequentemente e que partilhou comigo todos os bons e maus momentos que foi necessário ultrapassar, tendo sempre uma palavra de encorajamento e de amizade.

À Gizela Mendes, aluna de investigação, pela contribuição na realização da parte experimental e pela sua amizade.

Ao Alexandre Carvalho, aluno de investigação, pela contribuição na parte experimental.

Aos elementos do Laboratório de Farmacognosia pela integração e apoio que me proporcionaram.

Ao Eng.º João Carvalho pelo contributo na parte gráfica deste trabalho.

Ao Doutor Luís Cunha, pelos esclarecimentos prestados.

Aos colegas, amigos e familiares que, de uma forma ou de outra, têm aqui expressa a sua ajuda.

Aos meus Pais, pelo seu carinho e apoio incondicionais, o meu eterno agradecimento.

A todos quantos, de alguma forma, deram o seu contributo.

Abreviaturas e Símbolos

CV – coeficiente de variação;
DAD – Diode Array Detector;
DP – desvio padrão;
g – gramas;
HMF – hidroximetilfurfural;
HPLC – High Performance Liquid Chromatography;
inf. - inflexão;
L – litros;
m – massa;
min – minutos;
n – número de determinações;
nm – nanómetros;
nq – não quantificável;
s – segundos;
TR – tempo de retenção;
UA – unidades arbitrárias;
UV – Ultra-Violeta;
Vis – Visível;
 $\lambda_{\text{máx}}$ – comprimento de onda máximo.

Índice

Resumo	1
Abstract	3
1. Introdução e Objectivos	4
1.1 Introdução	5
1.2 Objectivos	9
2. Fundamentos Teóricos	10
2.1 Marmelada	11
2.1.1 Processo Produtivo	11
2.1.2 Controlo da Qualidade	13
2.2 Geleia de Marmelo	14
2.2.1 Processo Produtivo	15
2.2.2 Controlo da Qualidade	17
2.3 Estudos Fitoquímicos do Marmelo	18
2.3.1 Constituintes Voláteis do Marmelo	18
2.4 Os Compostos Fenólicos como Parâmetros Químicos de Autenticidade de Derivados dos Frutos de Maior Consumo em Portugal	23
2.4.1 Compostos Fenólicos: Generalidades	23
2.4.2 Compostos Fenólicos dos Frutos	27
2.4.2.1 Maçã	28
2.4.2.2 Laranja	28
2.4.2.3 Pêssego	32
2.4.2.4 Pêra	32
2.4.2.5 Uva	35
2.4.2.6 Ananás	35
2.4.2.7 Marmelo	38
3. Materiais e Métodos	41
3.1 Padrões e Reagentes	42
3.2 Amostras	42
3.2.1 Marmeladas	42
3.2.2 Geleias de Marmelo	43
3.3 Aparelhagem	44
3.4 Processos de Extracção	44
3.4.1 Extracção Simplificada pelo Metanol	44
3.4.1.1 Marmeladas	44
3.4.1.2 Geleias de Marmelo	45
3.4.2 Extracção através de uma Resina de Amberlite de XAD-2	45
3.5 Análise Cromatográfica dos Extractos	46

3.5.1 Condições Cromatográficas	46
3.5.2 Identificação	47
3.5.3 Quantificação	47
3.6 Validação do Método de Determinação do Benzoato de Sódio	48
3.6.1 Recuperação	48
3.6.2 Precisão	48
3.6.3 Linearidade	48
3.6.4 Limite de Detecção	49
4. Resultados e Discussão	50
4.1 Marmeladas	51
4.1.1 Aspecto Geral das Amostras	51
4.1.2 Compostos Fenólicos	53
4.1.2.1 Análise Qualitativa	53
4.1.2.2 Análise Quantitativa	58
4.1.3 Benzoato de Sódio	63
4.1.3.1 Validação do Método	63
4.1.3.1.1 Recuperação	65
4.1.3.1.2 Precisão	66
4.1.3.1.3 Linearidade	66
4.1.3.1.4 Limite de Detecção	66
4.1.3.2 Análise Quantitativa	66
4.2 Geleias de Marmelo	68
4.2.1 Aspecto Geral das Amostras	68
4.2.2 Compostos Fenólicos	70
4.2.2.1 Análise Qualitativa	70
4.2.2.2 Análise Quantitativa	73
5. Conclusões	75
6. Bibliografia	78

Resumo

Com o objectivo de determinar o perfil fenólico de marmeladas e geleias de marmelo e de verificar a sua autenticidade, várias amostras, caseiras e de diferentes marcas comerciais, foram analisadas por HPLC/Detector de Díodos.

Para a definição completa dos perfis polifenólicos destes derivados de marmelo foram necessários dois métodos de extracção: uma técnica simplificada de extracção com metanol e outra recorrendo a uma resina de Amberlite de XAD-2. De uma forma geral, usando o processo de extracção com Amberlite de XAD-2 a quantidade de cada um dos compostos fenólicos no extracto foi superior. No entanto, a extracção com metanol tornou-se necessária, uma vez que alguns compostos como a arbutina, o ácido gálgico e a procianidina B3, apresentavam uma taxa de recuperação inferior.

Neste estudo verificou-se que todas as amostras apresentavam um perfil fenólico idêntico com, pelo menos, oito compostos identificados. Em todas as marmeladas foram detectadas algumas procianidinas, ainda não identificadas, o que não aconteceu nas geleias de marmelo. Na maior parte das amostras de marmeladas industriais encontrou-se arbutina, o que sugere uma adulteração por adição de pêra. A presença das duas diidrochalconas características da maçã, 2'-*O*-xilossilglucosilfloreína e 2'-*O*-glucosilfloreína, não foi detectada. Nas amostras de geleia não foram encontrados os marcadores químicos da pêra ou da maçã, o que indica que não houve falsificações por adição destes dois frutos.

Verificou-se a presença de benzoato de sódio nos cromatogramas das marmeladas industriais, detectados a 280 nm. A taxa de recuperação deste conservante foi superior nos extractos obtidos através da técnica simplificada com metanol, sendo o limite de detecção de 0,5 µg/mL. O método de determinação deste composto é simples, rápido, sensível, reprodutível e exacto. De uma maneira geral, os teores em benzoato de sódio das marmeladas industriais foram inferiores ao

máximo estabelecido na legislação Portuguesa (1,5g de ácido benzóico/kg de marmelada), com a excepção de duas amostras de qualidade “light”.

Abstract

With the purpose of determining the phenolic profile of quince jams and jellies, in order to verify its authenticity, several samples, homemade and of different commercial origins, were analysed by HPLC/DAD.

For the complete definition of the polyphenolic profiles of these quince products it was necessary to use two extractive methods: a simplified technique with methanol and another procedure using an Amberlite XAD-2 resin. In a general way, when the extraction with Amberlite XAD-2 was used, the amount of each phenolic compound was superior. However, the extraction with methanol was necessary, once some compounds like arbutin, gallic acid and procyanidin B3, presented an inferior recovery rate.

In this study all samples presented a similar phenolic profile, composed of, at least, eight identified compounds. Some not identified procyanidins were detected in all jams, which was not observed in the quince jellies. Most of the industrial jams contained arbutin, which suggests an adulteration with pear. The presence of the characteristic dihydrochalcones from apple, phloretin 2'-*O*-xylosylglucoside and phloretin 2'-*O*-glucoside, was not detected. Jelly samples were not falsificated by addition of these fruits, once its chemical markers were not detected.

The presence of sodium benzoate was observed in the industrial quince jam chromatograms recorded at 280 nm. The recovery rate of this preservative was higher when the simplified extraction technique was used, exhibiting a detection limit of 0.5 µg/mL. The determination method of this compound is simple, rapid, sensitive, reproducible and accurate. In a general way, sodium benzoate in industrial jam samples was inferior to the maximum established in the Portuguese legislation (1.5g of benzoic acid/kg of quince jam), with the exception of two "light" samples.

1. Introdução e Objectivos

1.1 Introdução

O marmelo (*Cydonia oblonga* Miller) é um pomo amarelo, perfumado e tem uma casca pubescente (Volák e Stodola, 1990). A espécie, originária da Ásia Ocidental, onde o marmeleiro é espontâneo, difundiu-se progressivamente até à Europa Central e Países Mediterrânicos (Volák e Stodola, 1990).

Durante um longo período, este fruto foi apreciado pelo seu aroma em detrimento das suas qualidades alimentares ou medicinais. Desde a época de Hipócrates até ao século XVII, o marmelo foi considerado um dos frutos mais sãos e úteis, tendo lugar de destaque na medicina antiga pela sua adstringência. Durante muito tempo, pensou-se que se tratava de um antídoto de venenos. Este fruto é conhecido como sendo antidiarreico, calmante e adstringente (Ivers, 1983).

Apesar de perdida a sua antiga reputação, o marmeleiro continua a ser cultivado por toda a Europa, sendo os seus frutos utilizados na preparação de doces, compotas, geleias e xaropes e em fitoterapia (Ivers, 1983; Volák e Stodola, 1990). A polpa do marmelo contém açúcares, pectina, aminoácidos, vitamina C, óleos essenciais, compostos fenólicos e ácidos orgânicos, sendo o pH deste fruto próximo de 3,2 (Jackix, 1988).

Os derivados de marmelo mais consumidos em Portugal são a marmelada - produto resultante da mistura homogénea e consistente, obtida exclusivamente da cozedura do mesocarpo do marmelo com açúcares (Decreto-Lei n.º 97/84 de 28 de Março) e a geleia de marmelo - produto resultante da mistura de sumo e/ou extracto aquoso de marmelo e de açúcares, em quantidades adequadas, com consistência suficientemente gelificada (Decreto-Lei n.º 97/84 de 28 de Março e Portaria n.º 497/92 de 17 de Junho).

As marmeladas e geleias de marmelo, muito apreciadas pelos Portugueses, têm deixado de ser confeccionadas de forma artesanal e, quando produzidas industrialmente, por vezes, apresentam fraca qualidade (Gonçalves *et al.*, 1991).

Este decréscimo da produção caseira destes derivados de marmelo deve-se, fundamentalmente, aos condicionalismos e exigências de disponibilidade da “vida moderna”. As marmeladas e geleias de marmelo industriais são, por vezes, substituídas por inúmeros doces e compotas de outros frutos de elevada qualidade, sendo relegadas para um plano secundário por não satisfazerem, em geral, as exigências dos consumidores (Gonçalves *et al.*, 1991).

De um estudo de opinião realizado sobre a qualidade das marmeladas industriais correntes (Gonçalves *et al.*, 1991), são de destacar as seguintes considerações:

- Produtos da mesma marca, produzidos em tempos diferentes, não apresentam características constantes de cor, textura e sabor;
- Variações de cor no produto de uma mesma embalagem;
- Cristalização do açúcar à superfície;
- Exsudação excessiva, o que leva, por vezes, ao aparecimento de fungos na superfície do produto;
- Elevado teor em açúcar;
- Pontos negros na marmelada, causados pela presença de fragmentos de semente na massa de marmelo, o que confere uma má imagem ao produto;
- Emprego de outros frutos (maçã ou pêra) combinados com a polpa de marmelo, perdendo-se parcialmente os aromas e sabores característicos da marmelada;
- Embalagens deficientes e pouco atractivas, transmitindo uma má imagem do produto.

A garantia da autenticidade dos produtos alimentares, desde as matérias primas até ao produto final, é uma preocupação dos laboratórios de controlo da qualidade, dos consumidores (por razões económicas) e também da Indústria Agro-Alimentar (por razões concorrenciais). Nos derivados de frutos, é obrigatório, do ponto de vista legislativo, especificar a composição de todos os produtos e estabelecer limites de variação para cada tipo de produto. Do ponto de vista

económico, é essencial que os produtos sejam autênticos no sentido de evitar a concorrência desleal (Silva *et al.*, 1999a).

Para um melhor entendimento deste trabalho, considerou-se necessário definir autenticidade. Assim a autenticidade de um produto pode ser definida como a ausência de adulteração/falsificação, ou então como a presença de um conjunto de componentes que lhe são característicos (marcadores químicos) (Silva, 1999).

As falsificações dos alimentos são, geralmente, fraudes económicas e raramente constituem problemas de saúde pública; no entanto, podem levar a alterações do valor nutricional do produto. Um género alimentício é considerado falsificado quando se verifica qualquer uma das seguintes circunstâncias (Decreto-Lei n.º 28/84 de 20 de Janeiro): adição ao género alimentício de alguma substância, inclusivé um ingrediente, estranha à sua composição e natureza ou nele não permitida legalmente e que possa ter como consequências, entre outras, o aumento de peso ou volume, o encobrimento de má qualidade ou deterioração ou ainda a incorporação de um aditivo inadmissível; subtracção ao género alimentício de algum ingrediente ou constituinte, total ou parcialmente, de modo a desvirtuá-lo ou a empobrecê-lo quanto a qualidades nutritivas ou quanto à sua composição própria, legalmente fixada ou declarada; substituição do género alimentício, bem como de alguns dos seus ingredientes, total ou parcialmente, por outra substância de modo a imitá-lo.

De uma forma geral, uma só técnica analítica não é suficiente para cobrir todos os tipos de adulteração e, na grande maioria dos casos, só um conjunto de análises pode fornecer garantias sobre a autenticidade de determinado produto. Actualmente, existem métodos analíticos para determinar a maioria dos componentes conhecidos dos derivados de frutos. Várias técnicas cromatográficas têm sido usadas na determinação de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e muitos constituintes minoritários, tais como flavonóides e outros polifenóis, substâncias aromáticas, entre outras. A pesquisa de isótopos estáveis pode ser usada para determinar a adição de açúcares estranhos num sumo ou polpa

e, em certos casos, distinguir se um sumo é “fresco” ou reconstituído. Uma grande variedade de técnicas espectrométricas é usada para a análise de minerais e de elementos vestigiais. A Análise Multiparamétrica e certas técnicas, como a Espectroscopia de Infra-Vermelho ou a Pirólise/Espectroscopia de Massa, que produzem um conjunto muito extenso e complicado de dados, requerem a aplicação da Análise Multivariada dos Resultados (Stutsman e Page, 1997).

No que diz respeito aos derivados de frutos, as adulterações mais frequentes são a adição de água, açúcares, frutos de valor comercial inferior, extractos secundários de frutos e corantes (Silva *et al.*, 1999b,c).

O perfil de compostos fenólicos dos frutos pode ser utilizado para detectar adulterações, por adição de frutos de inferior valor comercial aos seus derivados genuínos. Este tipo de adulteração é dos mais frequentes nestes produtos.

Relativamente ao marmelo e aos seus derivados existem ainda poucos estudos. No entanto, recentemente, Andrade *et al.* (1998a) desenvolveram um método para detectar adulterações em polpas de marmelo por adição de maçã (*Malus communis* Lamk) e/ou pêra (*Pirus communis* Lin.), através do perfil fenólico. Para isso, analisaram purés de marmelo, maçã, pêra e uma mistura destes três frutos, na proporção de 60 : 20 : 20 de marmelo : maçã : pêra. O puré de maçã foi caracterizado pela presença das diidrochalconas 2'-*O*-xilossilglucosilfloreína e 2'-*O*-glucosilfloreína, e o de pêra pela presença de arbutina. Adicionalmente, verificaram que no puré de marmelo o ácido 3-*O*-cafeoilquínico está presente em quantidade apreciável (aproximadamente 23,4%), enquanto que o puré de pêra só contém 8,2% e no puré de maçã está ausente. Na mistura dos três purés, a maçã e a pêra foram facilmente detectadas, através da presença dos seus marcadores químicos, o que sugere que esta técnica pode ser utilizada na avaliação da autenticidade de polpas de marmelo e, eventualmente, de marmeladas e geleias de marmelo.

1.2 Objectivos

No presente trabalho tem-se como objectivo aplicar a metodologia de Andrade *et al.* (1998a) a diversos derivados de marmelo, de forma a verificar a sua autenticidade. Assim, investiga-se a presença dos marcadores químicos dos possíveis frutos adulterantes, ou seja, da 2'-*O*-xilossilglucosilfloretina e 2'-*O*-glucosilfloretina, no caso de adição de maçã, e da arbutina, no da pêra. Pretende-se ainda seleccionar o melhor método de extracção de cada um dos compostos fenólicos em estudo.

Um outro objectivo é o doseamento simultâneo de compostos fenólicos e do benzoato de sódio, o conservante mais usado nas marmeladas industriais, verificando assim se existem adições excessivas deste.

2. Fundamentos Teóricos

2.1 Marmelada

A marmelada é o resultado do processamento térmico de uma mistura homogénea de massa de marmelo e açúcares (Gonçalves *et al.*, 1991). Segundo a legislação Alimentar Portuguesa, uma marmelada “normal” deve conter uma quantidade mínima de 400g de marmelo por Kg de marmelada, subindo este valor para 500g de marmelo por Kg de marmelada quando se trata de uma marmelada “extra”. Para além disso, o teor em resíduo seco solúvel, determinado por refractometria a 20°C, deve ser igual ou superior a 60% (Decreto-Lei n.º 97/84 de 28 de Março).

As marmeladas caseiras são preparadas de acordo com a sazonalidade do fruto, ou seja, em Setembro/Outubro (Gonçalves *et al.*, 1991) ou durante o ano, guardando a massa de marmelo no congelador. Estas marmeladas são obtidas através da cozedura de marmelos com açúcar, até se atingir a textura e cor desejadas. Como é óbvio, estas marmeladas não contêm aditivos.

2.1.1 Processo Produtivo

O processo industrial de produção da marmelada envolve os seguintes passos (Gonçalves *et al.*, 1991):

- Recepção do marmelo

O marmelo é recebido e armazenado.

- Lavagem

Os marmelos têm uma casca pubescente com microrganismos, sujidades e, principalmente, terra acumulada durante a colheita e transporte. Proceda-se então a uma operação de lavagem com jactos de água.

- Selecção

Uma selecção criteriosa garante maior uniformidade e constância da qualidade do produto final; por isso, marmelos que tenham defeitos causados por microrganismos e insectos devem ser rejeitados.

- Corte em pedaços

A operação de corte visa o desenvolvimento de cor do marmelo e a redução do tempo de cozedura.

- Cozedura e prensagem

Os pedaços de marmelo são colocados numa panela juntamente com um conservante, em geral, o benzoato de sódio (E211). Em seguida são prensados em crivos de calibre apropriado que retêm as partes duras e deixam passar o puré com textura e granulometria convenientes e apropriadas ao fabrico de marmelada.

- Enchimento das barricas

O enchimento das barricas pode ser realizado directamente da panela através de uma torneira localizada na base. Antes da colocação dos tampos nas barricas, a área da massa de marmelo exposta ao ar é coberta com um outro conservante, o metabissulfito de potássio (E224).

- Armazenamento

As barricas são rotuladas (data de fabrico e proveniência do marmelo) e armazenadas em local seco e limpo, à temperatura ambiente. O tempo de vida da massa de marmelo armazenada nestas condições é superior a um ano.

- Mistura dos componentes e cozedura

A massa de marmelo é misturada como o açúcar numa bola de aço inoxidável e aquecida, a uma temperatura de aproximadamente 80°C, sob pressão, até uma concentração de cerca de 65/70°Brix, avaliada por refractometria.

- Embalagem

As embalagens são previamente tratadas com uma solução de lavagem e depois enxaguadas. Não é necessária uma operação de esterilização pois a temperatura do produto durante o enchimento é suficientemente alta.

- Rotulagem

O rótulo deve conter informações importantes, tais como (Decreto-Lei n.º 97/84 de 28 de Março e Decreto-Lei n.º 170/92 de 8 de Agosto): denominação de venda – “marmelada”; lista dos ingredientes - devem ser mencionados todos os produtos utilizados, por ordem decrescente da proporção ponderal no momento da sua incorporação; quantidade líquida; data limite de consumo; lote; nome, firma ou denominação social e morada do produtor, embalador, importador ou armazenista e devem ainda constar as seguintes menções – “preparado com ...g de marmelo por 100g”, teor total de açúcares ...g por 100g” e “deve conservar-se no frigorífico depois de aberto”.

▪ Armazenamento

O produto acabado é transportado para a zona de armazenamento, estando assim disponível para a expedição e comercialização.

2.1.2 Controlo da Qualidade

Um controlo da qualidade rigoroso é fundamental para assegurar a conformidade com as especificações em todas as etapas do processo produtivo. Tanto as matérias primas, como os produtos intermédios e o produto final têm de ser vigiados de forma regular e cuidada, no sentido de evitar anomalias.

A operação de selecção constitui a primeira etapa do controlo. Deve ser totalmente assegurado que todos os marmelos estão livres de qualquer dano físico ou microbiológico e se encontram no estado de maturação ideal.

Após a cozedura da massa de marmelo e antes do enchimento das barricas, o pH deve ser medido e ajustado a 2,8-3,5 (Portaria n.º 497/92 de 17 de Junho), com adição de ácido cítrico (E330).

Aquando da utilização da massa de marmelo armazenada, uma amostra de cada barrica deve ser microbiologicamente analisada e a concentração

hidrogeniónica novamente corrigida. A cor deve ser comparada qualitativamente com um padrão.

Durante a produção da marmelada, é fundamental a monitorização do teor em sólidos solúveis (°Brix), já que o seu teor final afecta tanto a cor, como a textura e o sabor da marmelada. Em geral, a cor da massa de marmelo, o teor em açúcar e o tempo de cozedura determinam a cor da marmelada, que deve ser constante. A cor varia de muito clara até avermelhada, em conformidade com a preferência dos consumidores, determinando o tipo de fabrico da empresa produtora.

A vistoria do produto acabado constitui a última etapa de controlo. Todas as embalagens devem estar em boas condições e perfeitamente acondicionadas.

Nesta indústria sugere-se o aproveitamento dos desperdícios do desencaroçamento para confecção de geleias de marmelo, que é um produto de maior valor acrescentado que a marmelada.

2.2 Geleia de Marmelo

A geleia é um produto obtido pela cocção de sumo e/ou extracto aquoso de frutos, com açúcar e água, concentrado até adquirir uma consistência gelatinosa. Pode sofrer a adição de glucose ou açúcar invertido, não podendo ser colorida nem aromatizada artificialmente, sendo tolerada a adição de reguladores de acidez e de pectina, para compensar qualquer deficiência no conteúdo natural de pectina ou acidez. A consistência deve ser tal que, quando extraída do seu recipiente, seja capaz de manter-se no estado semi-sólido. As geleias transparentes, que não contenham pedaços de marmelo deverão, ainda, apresentar elasticidade ao toque, retomando a sua forma primitiva após ligeira pressão (Jackix, 1988). Segundo a legislação Alimentar Portuguesa, uma geleia de marmelo “normal” deve conter uma quantidade mínima de 250g de marmelo por Kg de geleia, subindo este valor para

350g de marmelo por Kg de geleia quando se trata de uma geleia de marmelo “extra”. Para além disso, o teor em resíduo seco solúvel, determinado por refractómetro a 20°C, deve ser igual ou superior a 60% (Decreto-Lei n.º 97/84 de 28 de Março e Portaria n.º 497/92 de 17 de Junho).

As geleias de marmelo caseiras também são preparadas de acordo com a sazonalidade do fruto (Setembro/Outubro), em geral, a partir da cozedura dos desperdícios de marmelos usados na confecção de marmeladas (cascas e caroços) com açúcar, até se obter a cor e a consistência desejadas. Como é óbvio, estas geleias não contêm aditivos.

2.2.1 Processo Produtivo

Neste processo, o rendimento está intimamente relacionado com a qualidade e quantidade da pectina dos marmelos, com a extracção e a preservação desta durante o processamento. O processo industrial de produção da geleia de marmelo é feito da seguinte forma (Jackix, 1988):

- Recepção do marmelo

Os marmelos são recepcionados e armazenados.

- Lavagem e selecção

Após a lavagem, faz-se a selecção visando a mistura de marmelos inaduros com verdes, uma vez que os primeiros são mais ricos em aroma e sabor, enquanto que os últimos são ricos em pectina.

- Corte em pedaços

Os marmelos são cortados em pedaços finos, de modo a que a pectina possa ser facilmente extraída.

- Adição de água

Apenas uma quantidade mínima de água deve ser adicionada para a extracção. Se necessário, uma segunda ou mesmo uma terceira extracção pode ser

feita e misturada à primeira. Grandes quantidades de água devem ser evitadas, porque uma diluição excessiva da pectina exigiria longas horas de cocção, o que reduziria a sua capacidade de formar gel. Contudo, se a quantidade de água for muito pequena, o extracto torna-se viscoso e turvo, de difícil clarificação. Além disso, há o perigo de queimar a fruta durante a ebulição.

- Cozedura

O marmelo deve ser cozido para permitir a extracção do sumo e da pectina.

- Prensagem

Antes da prensagem, pode fazer-se uma primeira separação sólido-líquido nas despoldadeiras, onde se recupera grande parte do sumo. O bagaço esgotado segue, então, para a prensa.

- Clarificação

Se houver necessidade, após extracção do sumo, deve fazer-se a clarificação, recorrendo à centrifugação ou à filtração.

- Adição de açúcar e cozedura

O sumo e o açúcar são misturados e concentrados. A temperatura a atingir é de 90-92°C. A cocção é uma das etapas mais importantes no processo de fabrico das geleias, pois é nesta fase que ocorre a dissolução do açúcar, a união do açúcar com o ácido e a pectina, a coagulação de certos compostos orgânicos e a destruição de leveduras, esporos e enzimas. Esta operação deve ser feita o mais rápido possível para que não hajam perdas de sabor, alteração da cor, hidrólise da pectina e inversão excessiva da sacarose.

- Adição de ácido

O ácido cítrico deve ser adicionado um pouco antes de se atingir o ponto final de geleia, para evitar a hidrólise da pectina.

- Embalagem

As embalagens são previamente tratadas com uma solução de lavagem e depois enxaguadas. Não é necessária uma operação de esterilização pois a temperatura do produto durante o enchimento é suficientemente alta.

- Rotulagem

O rótulo deve conter as informações que foram referidas para as marmeladas, com a exceção da denominação de venda, que neste caso será “geleia de marmelo”.

- Armazenamento

O produto acabado é transportado para a zona de armazenamento, estando assim disponível para a expedição.

2.2.2 Controlo da Qualidade

Tal como acontece no caso das marmeladas, é essencial um controlo da qualidade rigoroso em todas as etapas do processo produtivo. Tanto as matérias primas, como os produtos intermédios e o produto final têm de ser vigiados regular e cuidadosamente, no sentido de evitar anomalias.

Geralmente, cada fábrica tem o seu próprio processo de produção e desenvolve qualidades peculiares para os seus produtos. No entanto, para se fazer uma boa geleia, deve-se ter sob controlo os seguintes factores: a quantidade de açúcar invertido e sacarose, a acidez/pH e o teor em sólidos solúveis.

Durante a cozedura, devido à acidez e à alta temperatura, a sacarose vai-se transformando em açúcar invertido, ou seja, em glucose e frutose. O excesso de açúcar invertido é indesejável, devendo variar entre 35 e 40% dos açúcares totais, o que corresponde a um teor máximo de 25% de açúcar invertido na geleia. Durante o processo de cocção, a quantidade de açúcar invertido formado será função do tempo, da temperatura e do pH (Jackix, 1988).

A acidez e o pH da geleia devem ser controlados. O pH deste produto deve rondar os 2,8-3,5 (Portaria n.º 497/92 de 17 de Junho).

O teor em sólidos solúveis também deve ser avaliado, uma vez que a legislação Portuguesa estabelece um teor mínimo de 60% no produto final (Portaria n.º 497/92 de 17 de Junho).

2.3 Estudos Fitoquímicos do Marmelo

O marmelo é um fruto que, mesmo quando maduro, não é edível devido à sua acidez e adstringência. No entanto, é frequentemente usado na confecção de marmeladas, doces e geleias de acentuado apreço em Portugal. Também há quem coma o marmelo cozido, em pedaços ou em puré, com açúcar. Apesar disso, existem ainda muito poucos estudos relativos a este fruto e aos seus derivados. Sabe-se que o marmelo contém açúcares, pectina, aminoácidos, vitamina C, óleos essenciais, compostos fenólicos, ácidos orgânicos e que tem um pH próximo de 3,2 (Jackix, 1988). Até ao momento, foram estudados os seus compostos voláteis (Schreyen *et al.*, 1979; Umano *et al.*, 1986; Winterhalter e Schreier, 1988; Winterhalter *et al.*, 1991; Guldner e Winterhalter, 1991; Lutz e Winterhalter, 1992 e 1993) e alguns compostos fenólicos (Porter *et al.*, 1985; Tommasi *et al.*, 1996) e foi estabelecido o perfil fenólico da polpa de marmelo (Ferreira *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998a e 1999).

2.3.1 Constituintes Voláteis do Marmelo

O estudo dos compostos voláteis do marmelo tem sido feito por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa. Schreyen *et al.* (1979) estudaram os óleos essenciais do marmelo, extraindo os compostos voláteis por destilação por arrastamento de vapor e por “headspace”. Nos cromatogramas obtidos foram

identificados setenta e nove componentes do óleo essencial, em que os ésteres, álcoois, alcanos, cetonas e terpenos representam os compostos maioritários. O 2-metil-2-butenato de etilo foi reconhecido como sendo um dos principais contribuintes do aroma típico do marmelo.

Em 1986, Umano *et al.* fizeram o estudo dos compostos voláteis existentes no óleo essencial da casca do marmelo, utilizando as mesmas metodologias que Schreyen *et al.* (1979). Verificou-se a predominância dos ésteres com pontos de ebulição baixos e que são os responsáveis pelo forte odor floral deste fruto. Os ésteres mais abundantes foram o acetato e o propionato de etilo. Os dois principais álcoois presentes na casca foram o etanol e o 2-metilpropanol. Quando comparado com o óleo essencial obtido do fruto, o da casca apresentou uma proporção muito menor de álcoois totais / ésteres totais. Foram também encontradas quantidades vestigiais de ácido acético, o qual confere um odor ligeiramente pungente ao óleo essencial da casca. O óleo essencial da casca de marmelo tem uma característica que o diferencia dos restantes óleos essenciais que é o seu baixo teor em terpenos. Os únicos terpenos encontrados foram o *trans*- α -farneseno e a β -ionona.

Na tabela 1, encontram-se apresentados os compostos voláteis identificados na polpa e na casca de marmelo.

Tabela 1 – Compostos voláteis encontrados na polpa e na casca de marmelo (adaptado de Schreyen *et al.*, 1979 e Umano *et al.*, 1986).

Compostos Voláteis	
Polpa	Casca
Metanol	Diacetilo
Etanal	2-Metil-1-propanol
Etanol	Etanol
Acetona	Acetona
1-Propanol	2-Metil-2-propenoato de etilo
2-Butanona	Heptanal
Acetato de etilo	Acetato de etilo
2-Metilpropanol	Álcool isoamílico
3-Metilbutanal	(<i>E</i>)-2-Hexenal
2-Metilbutanal	Álcool amílico
Benzeno	Acetoína
1-Butanol	1-Butanol
Propionato de etilo	Propionato de etilo
Acetato de propilo	Acetato de (<i>Z</i>)-3-hexenilo
2-Metil-2-butenal	Acetato de (<i>E</i>)-2-hexenilo
3-Metilbutanol	Isobutirato de hexilo
2-Metilbutanol	Hexanoato de isobutilo
2-Metilpropionato de etilo	(<i>Z</i>)-3-Hexenol
Tolueno	(<i>E</i>)-2-Hexenol
1-Pentanol	Butirato de hexilo
2-Metil-2-butenol-1-ol	(<i>E</i>)-2-Octenal
Formiato de 3-metilbutilo	2-Metilbutirato de hexilo
Hexanal	Hexanal
Butirato de etilo	Butirato de etilo
Acetato de butilo	Butirato de (<i>Z</i>)-3-hexenilo
Furfural	(<i>E</i>)-6-Octenoato de etilo
2-Butenoato de etilo	(<i>Z</i>)-6-Octenoato de etilo
2-Metilbutirato de etilo	2-Metilbutirato de etilo
3-Metilbutirato de etilo	3-Hidroxibutirato de etilo
<i>Cis</i> -3-hexeno-1-ol	Octanoato de propilo
Acetato de 3-metilbutilo	Octanoato de isobutilo

Tabela 1 (continuação) – Compostos voláteis encontrados na polpa e na casca de marmelo (adaptado de Schreyen *et al.*, 1979 e Umano *et al.*, 1986).

Compostos Voláteis	
Polpa	Casca
1-Hexanol	1-Hexanol
2-Heptanona	Ácido isobutírico
2-Acetilfurano	(<i>E</i>)-6-Nonenoato de etilo
Hexanoato de metilo	(<i>Z</i>)-6-Nonenoato de etilo
2-Metil-2-butenato de etilo	Octanoato de butilo
Benzaldeído	(<i>E</i>)-4-Decenoato de etilo
5-Metilfurfural	(<i>Z</i>)-4-Decenoato de etilo
2-Metil-2-hepteno-6-ona	(<i>E</i>)-7-Dodecenoato de etilo
2-Octanona	Hexanoato de etilo
Hexanoato de etilo	β -Ionona
3-Hexenoato de etilo	Éter metílico de eugenilo
Acetato de <i>cis</i> -3-hexenilo	Tetradecanoato de etilo
Acetato de hexilo	Acetato de hexilo
Trimetilbenzeno	(<i>E</i>)-9-Tetradecenoato de etilo
2-Metil-2-butenato de propilo	Ácido cáprico
Álcool benzílico	(<i>Z</i>)-9-Tetradecenoato de etilo
2-Hexenoato de etilo	γ -Decalactona
2,6-Dimetil-2-heptenal	Eugenol
Limoneno	Limoneno
5-Nonanona	Ácido 2,7-dimetil-4-hidroxi-5(<i>E</i>), 7-octadienoicolactona
1-Octanol	1,2,3-Trimetil-5-(2-propenil)benzeno
Monoacetato de hidroquinona	Hexadecanoato de etilo
2-Nonanona	Heptanoato de etilo
Heptanoato de etilo	γ -Dodecalactona
2-Feniletanol	Acetaldeído
Acetato de benzilo	Isobutirato de etilo
Linalol	Acetato de isobutilo
3-Metilbutirato de 3-metilbutilo	2-Butanol
Acetato de heptilo	Acetato de butilo
3-Metilbutirato de 2-metilbutilo	Propionato de isobutilo
Octanoato de metilo	

Tabela 1 (continuação) – Compostos voláteis encontrados na polpa e na casca de marmelo (adaptado de Schreyen *et al.*, 1979 e Umano *et al.*, 1986).

Compostos Voláteis	
Polpa	Casca
Hexanoato de 2-metilpropilo	Isobutirato de isobutilo
Benzoato de etilo	3-Butenoato de etilo
Citral	Acetato de isoamilo
2-Decanona	Pentanoato de etilo
Octanoato de etilo	Octanoato de etilo
α -Terpineol	Isobutirato de butilo
Benzotiazol	Butirato de isobutilo
γ -Caprolactona	2-Butenoato de etilo
β -Decalona	Butirato de butilo
Nonanoato de etilo	Nonanoato de etilo
Decanoato de etilo	Decanoato de etilo
Benzoato de 3-metilbutilo	3-Hexenoato de etilo
Cinamato de etilo	Ácido acético
<i>Trans</i> - β -farneseno	<i>Trans</i> - β -farneseno
Dodecanoato de etilo	Dodecanoato de etilo
2-Pentadecanona	

Winterhalter e Schreier (1988) isolaram alguns constituintes do sumo de marmelo, através da extracção com pentano/diclorometano (2/1). Nas fracções polares revelou-se a ocorrência de alguns norisoprenóides com treze átomos de carbono encontrados no marmelo pela primeira vez: 4-hidroxi- β -ionol, 3-hidroxi- β -ionol, 4-hidroxi- β -ionona, 4-oxo- β -ionol, 3-hidroxi- β -ionona, 5,6-diidroxi- β -ionona e deidrovomifoliol. A hidrólise enzimática do extracto glicosídico levou à identificação do 3-hidroxi- β -ionol como o principal constituinte. Adicionalmente, foram encontradas as seguintes agliconas: 3-hidroxi- β -ionona, 3-hidroxi-7,8-diidroxi- β -ionol, vomifoliol, 3-oxo- α -ionol e 7,8-diidroxi-vomifoliol.

Em 1991, Winterhalter *et al.* isolaram do marmelo e caracterizaram o β -D-gentiobiósido [β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo] de 3-hidroxi- β -ionol. Este composto tem um papel importante como precursor de alguns norisoprenóides com treze átomos de carbono com aroma do óleo essencial de marmelo. Guldner e Winterhalter (1991) encontraram os β -D-gentiobiósidos [β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo] e o β -D-glucopiranosídeo de (3R)-3-hidroxi- β -ionona. Em 1992, Lutz e Winterhalter isolaram e caracterizaram o álcool (S)-abcísico e o β -D-glucopiranosídeo de (4R,1'E,3'E)-4-(5'-hidroxi-3'-metil-1',3'-pentadienil)-3,5,5-trimetil-2-ciclohexeno-1-ona. Um ano mais tarde, os mesmos autores, isolaram o álcool *trans*-abcísico β -D-glucopiranosídeo.

Para além destes estudos, também existem outros relativos aos compostos fenólicos do marmelo (Porter *et al.*, 1985; Tommasi *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998a e 1999) que serão apresentados no capítulo 2.4.2.7.

2.4 Os Compostos Fenólicos como Parâmetros Químicos de Autenticidade de Derivados dos Frutos de Maior Consumo em Portugal

2.4.1 Compostos Fenólicos: Generalidades

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários presentes em todo o Reino Vegetal. Pela sua ubiquidade e, simultaneamente pela sua composição característica dentro dos grupos botânicos, alguns deles podem ser considerados marcadores químicos dos derivados de frutos (Simón *et al.*, 1992; van Gorsel *et al.*, 1992).

Na natureza são numerosas as substâncias de natureza fenólica, sendo as mais abundantes os ácidos fenólicos, os taninos e os flavonóides (Riberéau-Gayon, 1968). Menos distribuídos citam-se as cumarinas, as catequinas e as procianidinas.

A denominação geral de ácidos fenólicos engloba os ácidos benzóicos, com sete átomos de carbono ($C_6 - C_1$), e os ácidos cinâmicos, com nove átomos de carbono ($C_6 - C_3$). As estruturas gerais destes ácidos encontram-se representadas nas figuras 1 e 2.

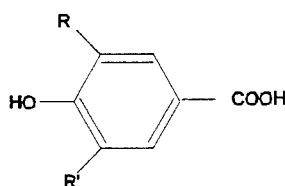


Figura 1 - Estrutura geral dos ácidos benzóicos (adaptado de Riberéau-Gayon, 1968).

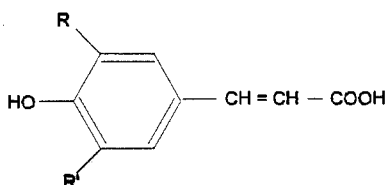


Figura 2 - Estrutura geral dos ácidos cinâmicos (adaptado de Riberéau-Gayon, 1968).

Os ácidos fenólicos encontram-se na natureza sob a forma de combinações do tipo éster ou sob a forma de glicósidos. O ácido 5-*O*-cafeoilquínico, conhecido como ácido clorogénico, é um éster do ácido cafeico e do ácido quínico e constitui a combinação mais frequente na natureza (Riberéau-Gayon, 1968).

Os flavonóides são caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos benzénicos ligados por uma cadeia com três átomos de carbono que pode, ou não, formar um terceiro anel, com a estrutura geral $C_6-C_3-C_6$. Por convenção, designam-se os anéis por A, B e C e o sistema de numeração para a maioria dos flavonóides é

o representado na figura 3, apresentando as chalconas e as auronas um esquema de numeração próprio. Conforme a natureza da cadeia de ligação de três átomos de carbono, assim surgem as diferentes classes de flavonóides (figura 4): flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonas, diidroflavonóis, auronas e chalconas (Riberéau-Gayon, 1968; Mabry *et al.*, 1970; Markham, 1982).

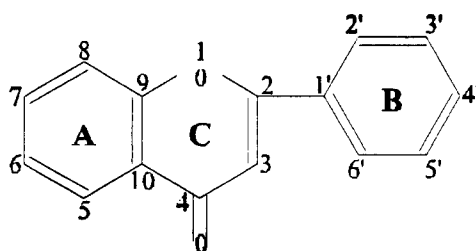
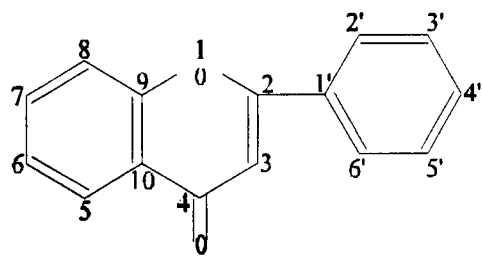


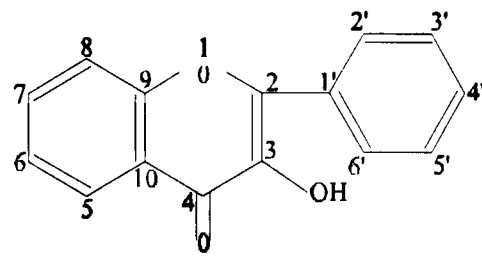
Figura 3 - Sistema de numeração para a maioria dos flavonóides (adaptado de Riberéau-Gayon, 1968).

Na classe dos flavonóides, podem ainda incluir-se as antocianinas, que são os pigmentos fenólicos mais abundantes na natureza.

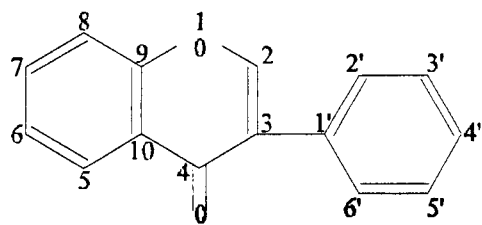
Os compostos fenólicos são utilizados como marcadores de autenticidade por possuírem três características (Macheix *et al.*, 1990): ubiquidade – todos os frutos e respectivos derivados que já foram estudados contêm um grande número de compostos fenólicos, em quantidades facilmente mensuráveis; especificidade – a distribuição dos fenóis depende do controlo genético, o que permite que estes sejam usados como marcadores taxonómicos para a classificação de cultivares; multiplicidade – uma determinada espécie contém um conjunto de compostos fenólicos, o que, geralmente, torna possível associar um perfil químico ao derivado desse fruto. Este “fingerprint” deve ser considerado tanto qualitativamente como quantitativamente, estabelecendo, por exemplo, relações entre diferentes constituintes fenólicos.



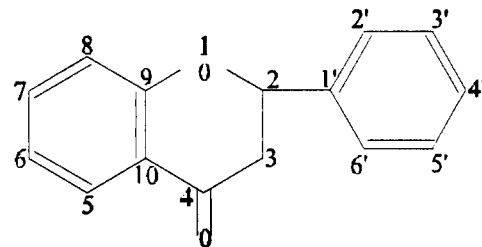
Flavonas



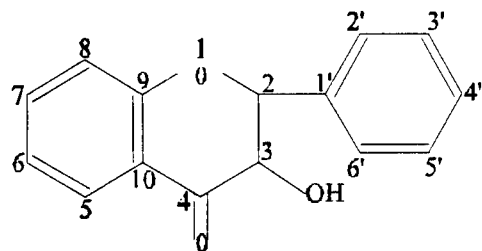
Flavonóis



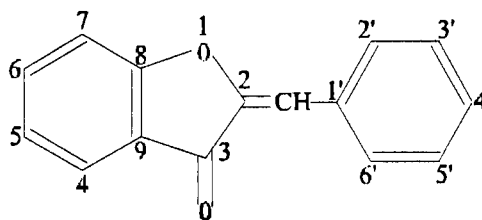
Isoflavonas



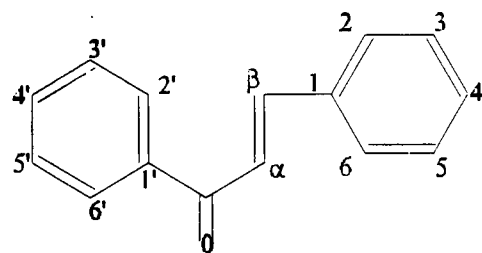
Flavanonas



Diidroflavonóis



Auronas



Chalconas

Figura 4 - Diferentes classes de flavonóides (adaptado de Ribereau-Gayon, 1968).

2.4.2 Compostos Fenólicos dos Frutos

Os compostos fenólicos dos frutos têm grande influência nas suas qualidades sensoriais (cor, adstringência e sabor/aroma), que podem ser afectadas durante os processos tecnológicos usados na obtenção dos sumos e de outros produtos transformados (Spanos e Wrolstad, 1990a; Spanos *et al.*, 1990).

O estudo da composição polifenólica dos frutos também é de grande interesse devido às diferenças qualitativas e quantitativas que ocorrem em função da variedade, das condições de crescimento, do grau de amadurecimento e das condições de armazenamento (Spanos e Wrolstad, 1990b).

Os perfis polifenólicos dos derivados de fruta, adulterados ou não, têm sido estudados através da utilização de técnicas de separação por HPLC. Conforme já foi referido, como certos compostos fenólicos são característicos de determinados frutos, podem ser usados como marcadores químicos desses frutos.

Neste capítulo faz-se o estudo dos perfis fenólicos que podem funcionar como marcadores químicos e, por isso, permitem detectar adulterações em alguns derivados dos frutos de maior consumo em Portugal (Silva, 1999) – maçã (*Malus communis* Lamk), laranja (*Citrus sinensis* Lin.), pêsego (*Prunus persica* Lin.), pêra (*Pirus communis* Lin.) e uva (*Vitis vinifera* Lin.) - tais como sumos, néctares, polpas, geleias, compotas, doces, etc.

Como os sumos, néctares e refrigerantes de ananás (*Ananas comosus* Merril) apresentam níveis de consumo consideráveis, também se fez o estudo deste fruto.

A análise dos parâmetros de autenticidade do marmelo (*Cydonia oblonga* Mill.) mostrou-se de grande interesse, devido ao facto da marmelada e da geleia de marmelo, dentro dos doces, compotas e geleias, serem produtos de grande consumo em Portugal (Silva, 1999) e de serem matrizes pouco estudadas.

2.4.2.1 Maçã

A maçã é um fruto largamente consumido em Portugal, sendo também bastante utilizada na produção de sumos, néctares, doces, compotas e geleias. Este fruto já foi estudado por vários autores (Oleszek *et al.*, 1988; Spanos *et al.*, 1990; Simón *et al.*, 1992; van Gorsel *et al.*, 1992; Tomás-Lorente *et al.*, 1992; Pérez-Illzarbe *et al.*, 1992; Spanos e Wrolstad, 1992; Tomás-Barberan *et al.*, 1993; Vallés *et al.*, 1994; Bengoechea *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998a), tendo o perfil fenólico apresentado na tabela 2. Os derivados hidroxicinâmicos e os flavonóides, tais como as procianidinas e as diidrochalconas, são os polifenóis mais abundantes na maçã, contribuindo para o seu sabor. Para além disso, os compostos fenólicos podem ser utilizados como índices de autenticidade nos derivados de frutos; por exemplo, a maçã pode ser facilmente detectada pela presença dos seus compostos característicos, a 2'-*O*-xilossilglucosilfloreína e a 2'-*O*-glucosilfloreína (Andrade *et al.*, 1998a).

2.4.2.2 Laranja

Originária da China Meridional, a laranja é cultivada em todo o Mundo, em regiões de clima soalheiro. O sumo de laranja merece uma referência especial, pois é o mais conhecido e consumido. Este produto pode ser facilmente adulterado por adição de água ou de outros sumos ou componentes de menor valor comercial (Ooghe *et al.*, 1994a).

Actualmente existem três espécies de *Citrus* que são usados na produção de sumos: *Citrus sinensis* ou laranjas doces, *Citrus reticulata* ou tangerinas e *Citrus aurantium* ou laranjas amargas/azedas, podendo também ser utilizados tangores ou híbridos de laranja doce e tangerina como Murcott, Temple e Topaz (Ooghe e Detavernier, 1997).

Tabela 2 – Perfil fenólico da maçã e derivados (adaptado de Simón *et al.*, 1992; van Gorsel *et al.*, 1992; Tomás-Lorente *et al.*, 1992; Pérez-Ilzarbe *et al.*, 1992; Vallés *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998a; Silva *et al.*, 1998 e 1999a,d).

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos
Aldeídos Benzóicos	aldeído <i>p</i> -hidroxibenzóico
	aldeído vanílico (vestígios)
	aldeído siringico (vestígios)
	aldeído 3,4-diidroxibenzóico
Ácidos Benzóicos	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (vestígios)
Ácidos Cinâmicos	ácido <i>p</i> -cumárico
	ácido ferúlico (vestígios)
	ácido cafeico
	ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido <i>p</i> -cumaroilquínico
Flavonóis	feruloilglucose
	quercetina
	kaempferol
	rutina
	3- <i>O</i> -galactosilquercetina
	3- <i>O</i> -glucosilquercetina
	3- <i>O</i> -arabinosilquercetina
3- <i>O</i> -xilosilquercetina	
Diidrochalconas	3- <i>O</i> -ramnosilquercetina
	2'- <i>O</i> -xilosilglucosilfloreína*
Catequinas	2'- <i>O</i> -glucosilfloreína*
	(+)-catequina
Procianidinas	(-)-epicatequina
	procianidina B1
	procianidina B2
	procianidina B5
Cumarinas	procianidina C1
	esculetina
Antocianinas	3- <i>O</i> -arabinosilcianidina
	7- <i>O</i> -arabinosilcianidina ou 3- <i>O</i> -glucosilcianidina
	3- <i>O</i> -galactosilcianidina

* marcador químico

Os países da União Europeia não permitem a comercialização de misturas de sumos de diferentes espécies de *Citrus*, sob a designação de “sumo de laranja”, que é exclusivamente reservada a sumos de *Citrus sinensis* (Dir 93/77/CEE de 21 de Setembro).

A adição de sumos de qualquer espécie de *Citrus* ou híbrido a *Citrus sinensis* pode ser detectada a partir do perfil de flavonóides (Ooghe e Detavernier, 1997).

O sumo de *Citrus sinensis* apresenta um perfil que inclui sinensetina, quercetagetina, nobiletina, heptametoxiflavona, escutelareína e tangeretina. A adição de sumos de tangerina (*Citrus reticulata*) e/ou de híbridos pode ser detectada por alterações significativas neste perfil. A adição de ambos os sumos provoca um decréscimo relativo de sinensetina e um aumento relativo de tangeretina, pelo que a relação sinensetina/tangeretina é um importante indicador de tais falsificações (Ooghe *et al.*, 1994a).

No sumo de *Citrus sinensis* a razão hesperidina/narirutina deve ter um valor mínimo de 3. A adição de sumo de tangerina e/ou de Murcott (híbrido de laranja e tangerina) pode ser detectada pelo decréscimo desta razão (Ooghe *et al.*, 1994b).

Através de diversas relações entre flavonóides podem detectar-se adulterações (Ooghe *et al.*, 1994a; Ooghe e Detavernier, 1997), sendo as mais relevantes a sinensetina/tangeretina, a nobiletina/sinensetina, a nobiletina/heptametoxiflavona, a nobiletina/escutelareína, a heptametoxiflavona/tangeretina e a tangeretina/quercetagetina. Quando duas ou até uma das dez razões de flavonóides não se encontram nos limites estipulados (tabela 3) deve suspeitar-se da genuinidade do sumo e utilizar outra metodologia que permita retirar tal suspeita.

A adição de pequenas quantidades de outros citrinos pode ainda ser detectada pela presença de naringina ou de alguns flavonóides específicos ausentes em *Citrus sinensis* (Ooghe *et al.*, 1994b).

Tabela 3 – Perfil de flavonóides em sumos de laranja autênticos (área de pico \pm DP)
(adaptado de Ooghe *et al.*, 1994a; Ooghe e Detavernier, 1997e Silva *et al.*, 1999a,b).

Flavonóides		Razão de Flavonóides	
Sinensetina	26,779 \pm 1,969	Sinensetina/Quercetagetina	4,496 \pm 0,707
Quercetagetina	6,104 \pm 1,056	Sinensetina/Heptametoxiflavona	2,201 \pm 0,423
Nobiletina	34,576 \pm 1,751	Sinensetina/Tangeretina*	4,169 \pm 0,942
Heptametoxiflavona	12,555 \pm 2,232	Nobiletina/Sinensetina*	1,299 \pm 0,127
Escutelareína	11,962 \pm 1,533	Nobiletina/Heptametoxiflavona*	2,845 \pm 0,550
Tangeretina	6,678 \pm 1,215	Nobiletina/Escutelareína*	2,935 \pm 0,380
		Nobiletina/Tangeretina	5,323 \pm 0,867
		Heptametoxiflavona/Escutelareína	1,082 \pm 0,324
		Heptametoxiflavona/Tangeretina*	1,955 \pm 0,539
		Tangeretina/Quercetagetina*	1,152 \pm 0,384

* índice de autenticidade

A detecção da adição de “água de lavagem da polpa” a sumos é um problema para os organismos de controlo oficial, uma vez que se defende o mercado global e este procedimento é permitido nos EUA, sendo, no entanto, proibido na União Europeia.

A “água de lavagem da polpa” é preparada a partir da polpa do fruto da qual foi retirado o sumo, de forma a recuperar uma pequena percentagem do mesmo que permanece nos restos do fruto. Após algum tempo de contacto entre a água e a polpa obtém-se uma mistura água/sumo que, depois, vai ser adicionada ao sumo, antes da concentração final. Os sólidos obtidos a partir da polpa são muitas vezes tratados com enzimas, com o objectivo de degradar algumas das pectinas, o que permite uma concentração entre 40 e 60°Brix. Este processo pode ainda ser levado mais longe e, adicionalmente, fazer-se a extracção das cascas, tal como da polpa, de maneira a obter extractos secundários de frutos (Hammond, 1996).

Foram propostos diversos métodos de detecção da adição de “água de lavagem da polpa” a sumos de citrinos; a maior parte deles envolve a detecção de componentes presentes em concentrações mais elevadas na polpa/casca do que no

sumo, tais como hesperidina, cálcio e pectina (Hammond, 1996). Contudo, devido às grandes variações naturais destes componentes, a confirmação da adição de “água de lavagem da polpa” é quase impossível.

Foi sugerida uma técnica de detecção de “água de lavagem da polpa” em sumos de laranja, envolvendo a determinação dos valores relativos de hesperidina e narirutina (Wade *et al.*, 1992). A adição de pequenas quantidades de “água de lavagem da polpa” afecta significativamente a taxa narirutina/hesperidina, provocando-lhe um aumento.

2.4.2.3 Pêssego

O pêssego é um alimento muito saboroso e os seus derivados, nomeadamente sumos, néctares, doces, compotas e geleias, são bastante apreciados. Este fruto é caracterizado pelo perfil fenólico apresentado na tabela 4 não tendo, no entanto, marcadores químicos característicos. Contudo, é de salientar a sua riqueza em miricetina e ácido 5-*O*-cafeoilquínico (Simón *et al.*, 1992).

2.4.2.4 Pêra

A pêra tem um composto fenólico que lhe é característico, a arbutina (Spanos e Wrolstad, 1990b; Spanos e Wrolstad, 1992; Tomás-Lorente *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 1998a), pelo que a sua presença em derivados de outros frutos é um indicador de adulteração. O seu perfil fenólico é apresentado na tabela 5, tendo como composto maioritário o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (Andrade *et al.*, 1998a).

Tabela 4 – Perfil fenólico do pêssego e derivados (adaptado de Macheix *et al.*, 1990; Simón *et al.*, 1992; van Gorsel *et al.*, 1992; Tomás-Lorente *et al.*, 1992 e Silva *et al.*, 1999a).

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos
Aldeídos Benzóicos	aldeído <i>p</i> -hidroxibenzóico
	aldeído vanílico
	aldeído siringico
	aldeído 3,4-diidroxibenzóico
Ácidos Benzóicos	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
	ácido <i>p</i> -cumárico
Ácidos Cinâmicos	ácido <i>p</i> -cumaroilquínico
	<i>p</i> -cumaroilglucose
	ácido ferúlico
	ácido feruloilquínico
	ácido cafeico
	ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido dicafeoilquínico
Flavonóis	miricetina
	quercetina
	kaempferol
	rutina
	3- <i>O</i> -galactosilquercetina
	3- <i>O</i> -glucosilquercetina
	3- <i>O</i> -arabinosilquercetina
	3- <i>O</i> -xilosilquercetina
	3- <i>O</i> -glucosilkaempferol
	3- <i>O</i> -galactosilkaempferol
3- <i>O</i> -ramnosilkaempferol	
Catequinas	(+)-catequina
	(+)-galhocatequina
	(-)-epicatequina
	(-)-epigalhocatequina
Cumarinas	esculetina (vestígios)
Antocianinas	3- <i>O</i> -glucosilcianidina
	3- <i>O</i> -ramnosilglucosilcianidina

Tabela 5 – Perfil fenólico da pêra e derivados (adaptado de Macheix *et al.*, 1990; Simón *et al.*, 1992; Spanos e Wrolstad, 1990b; Spanos e Wrolstad, 1992; Tomás-Lorente *et al.*, 1992; Oleszek *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998a; Silva *et al.*, 1998 e 1999a,d).

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos
Aldeídos Benzóicos	aldeído vanílico
	aldeído siringico
	aldeído 3,4-diidroxibenzóico (vestígios)
Ácidos Benzóicos	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
	ácido ferúlico (vestígios)
Ácidos Cinâmicos	ácido feruloilquínico
	feruloilglucose
	ácido cafeico
	ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido dicafeoilquínico
	ácido cafeoilmálico
	ácido <i>p</i> -cumárico
	ácido <i>p</i> -cumaroilquínico
	ácido dicumaroilquínico
	ácido <i>p</i> -cumaroilmálico
	Flavonóis
rutina	
3- <i>O</i> -galactosilquercetina	
3- <i>O</i> -glucosilquercetina	
3- <i>O</i> -ramnosilquercetina	
7- <i>O</i> -xilosilquercetina	
glucomalato de quercetina	
ramnogalactosil isoramnetina	
galactomalonato de isoramnetina	
glucomalonato de isoramnetina	
glucomalonato de kaempferol	

Tabela 5 (continuação) – Perfil fenólico da pêra e derivados (adaptado de Macheix *et al.*, 1990; Simón *et al.*, 1992; Spanos e Wrolstad, 1990b; Spanos e Wrolstad, 1992; Tomás-Lorente *et al.*, 1992; Oleszek *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998a; Silva *et al.*, 1998 e 1999a,d).

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos
Catequinas	(+)-catequina
	(-)-epicatequina
Antocianinas	3- <i>O</i> -arabinosilcianidina
	3- <i>O</i> -galactosilcianidina
Hidroquinonas	arbutina*

*marcador químico

2.4.2.5 Uva

A uva é um alimento leve, saboroso e doce; a sua presença pode ser detectada através da identificação de ésteres hidroxicinâmicos com ácido tartárico (Simón *et al.*, 1992). Este fruto é rico em antocianinas, sendo a 3-*O*-glucosildelfinidina, a 3-*O*-glucosilmalvidina e a 3-*O*-glucosilpeonidina compostos característicos, cuja presença em produtos obtidos de outros frutos é um indicador de adulteração. A uva não tem na sua constituição ácido 5-*O*-cafeoilquínico, que é um dos ácidos fenólicos mais abundantes na natureza (Simón *et al.*, 1992). O perfil deste fruto e dos seus derivados encontra-se na tabela 6.

2.4.2.6 Ananás

O ananás foi descoberto no século XVI no Brasil, mas só foi cultivado na Europa cerca de 200 anos mais tarde. Este fruto é bastante apreciado na forma de sumos, néctares, compotas e conservas. Apesar de não ter um marcador químico característico, apresenta um perfil fenólico (tabela 7) contendo ácido sinápico e

muito poucos flavonóis (Simón *et al.*, 1992). O ananás, à semelhança da uva, não tem na sua constituição ácido 5-*O*-cafeoilquínico (Simón *et al.*, 1992).

Tabela 6 – Perfil fenólico da uva e derivados (adaptado de Jaworski e Lee, 1987; Macheix *et al.*, 1990; Simón *et al.*, 1992; van Gorsel *et al.*, 1992; Garcia-Viguera e Bridle, 1995; Andrade *et al.*, 1998b e Silva *et al.*, 1999a).

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos
Aldeídos Benzóicos	aldeído 3,4-diidroxibenzóico
Ácidos Benzóicos	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
	ácido <i>o</i> -hidroxibenzóico
	ácido 3,4-diidroxibenzóico
	ácido gálhico
	ácido vanílico
	ácido siríngico
Ácidos Cinâmicos	ácido cafeoiltartárico*
	ácido cumaroiltartárico*
	ácido <i>p</i> -cumárico
	<i>p</i> -cumaroilglucose
	ácido ferúlico
	ácido feruloiltartárico*
Flavonóis	feruloilglucose
	ácido cafeico
	miricetina
	isoramnetina
	kaempferol
	quercetina
	rutina
	3- <i>O</i> -galactosilquercetina
	3- <i>O</i> -glucoronilquercetina
	3- <i>O</i> -glucosilquercetina
3- <i>O</i> -ramnosilquercetina	
3- <i>O</i> -rutinosilkaempferol	
3- <i>O</i> -glucoronilkaempferol	

*marcador químico

Tabela 6 (continuação) – Perfil fenólico da uva e derivados (adaptado de Jaworski e Lee, 1987; Macheix *et al.*, 1990; Simón *et al.*, 1992; van Gorsel *et al.*, 1992; Garcia-Viguera e Bridle, 1995; Andrade *et al.*, 1998b e Silva *et al.*, 1999a).

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos
Flavonóis	3- <i>O</i> -glucosilkaempferol
	3- <i>O</i> -galactosilkaempferol
	3- <i>O</i> -glucoronilmiricetina
	3- <i>O</i> -glucosilmiricetina
	3- <i>O</i> -ramnosilmiricetina
	3- <i>O</i> -glucosilisoramnetina
Catequinas	(+)-catequina
	(+)-galthocatequina
	(-)-epicatequina
	(-)-epigalthocatequina
Procianidinas	procianidina B2
	procianidina B3
Antocianinas	3- <i>O</i> -glucosilcianidina
	3- <i>O</i> -acetilglucosilcianidina
	3- <i>O</i> -cumaroilglucosilcianidina
	3- <i>O</i> -glucosildelfinidina*
	3- <i>O</i> -acetilglucosildelfinidina
	3- <i>O</i> -cumaroilglucosildelfinidina
	3- <i>O</i> -glucosilmalvidina*
	3- <i>O</i> -acetilglucosilmalvidina
	3- <i>O</i> -cumaroilglucosilmalvidina
	3- <i>O</i> -cafeoilglucosilmalvidina
	3- <i>O</i> -glucosilpeonidina*
	3- <i>O</i> -acetilglucosilpeonidina
	3- <i>O</i> -cumaroilglucosilpeonidina
	3- <i>O</i> -glucosilpetunidina
3- <i>O</i> -acetilglucosilpetunidina	
3- <i>O</i> -cumaroilglucosilpetunidina	
Outros	tirosol

*marcador químico

Tabela 7 – Perfil fenólico do ananás e derivados (adaptado de Macheix *et al.*, 1990; Simón *et al.*, 1992; Larrauri *et al.*, 1997 e Silva *et al.*, 1999a).

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos
Aldeídos Benzóicos	aldeído vanílico (vestígios)
	aldeído siríngico
	aldeído 3,4-diidroxibenzóico (vestígios)
	aldeído <i>p</i> -hidroxibenzóico
Ácidos Benzóicos	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
	ácido <i>o</i> -hidroxibenzóico
Ácidos Cinâmicos	ácido <i>p</i> -cumárico
	ácido <i>p</i> -cumaroilquinico
	ácido dicumaroilquinico
	<i>p</i> -cumaroilglucose
	ácido cafeico
	cafeoilglucose
	ácido ferúlico
	feruloilglucose
ácido sinápico	
sinapoilglucose	
Flavonóis	miricetina
Taninos	ácido tânico

2.4.2.7 Marmelo

Como já foi referido, o marmelo não pode ser consumido sob a forma de sumo, sendo bastante apreciado na forma de marmelada, geleia ou cozido em fatias com açúcar. Quando a produção de marmelo é escassa e/ou os preços da maçã e da pêra são mais baixos, os derivados de marmelo podem ser adulterados por adição destes dois frutos. Organolepticamente, a adulteração passa despercebida devido ao forte sabor/aroma do marmelo e à semelhança da textura dos três frutos. Do ponto de vista qualitativo, esta falsificação pode ser detectada pela pesquisa dos marcadores químicos da maçã e da pêra. Do ponto de vista quantitativo, verifica-se que no puré de marmelo o ácido 3-*O*-cafeoilquinico está presente em quantidade

apreciável (aproximadamente 23,4%), enquanto que o puré de pêra só contem 8,2%, e no puré de maçã está ausente (Andrade *et al.*, 1998a). O marmelo é caracterizado pela presença de glicósidos de procianidinas ainda não identificados (Porter *et al.*, 1985; Andrade *et al.*, 1998a) e o ácido fenólico presente em maior quantidade é o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (Andrade *et al.*, 1998a). O perfil fenólico do marmelo está apresentado na tabela 8.

Tabela 8 – Perfil fenólico do marmelo e derivados (adaptado de Porter *et al.*, 1985; Ferreira *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998a e 1999; Silva *et al.*, 1998 e 1999a,d).

Classe de Compostos Fenólicos	Compostos Fenólicos
Ácidos Cinâmicos	ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico
	ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico
Flavonóis	rutina
	3- <i>O</i> -galactosilquercetina
	3- <i>O</i> -xilosilquercetina
	3- <i>O</i> -ramnosilquercetina
Procianidinas	glicósidos de polímeros de procianidinas não identificados*

*marcador químico

Nas folhas do marmeleiro foram efectuados estudos por Tommasi *et al.* (1996), tendo sido isolados e identificados quatro novos glicosilflavonóis e nove glicósidos de α -ionol, juntamente com os já conhecidos 3-oxo- α -ionol 9-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido, vomifoliol 9-*O*- β -D-glucopiranosido e volifoliol 9-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido.

De tudo o que foi referido, verifica-se que o perfil de compostos fenólicos constitui actualmente um dos parâmetros químicos mais utilizados no controlo da qualidade/autenticidade de derivados de frutos. Tudo indica que continuará a ser

assim, dada a relativa facilidade da determinação analítica do perfil fenólico dos referidos produtos. A técnica de HPLC/Detector de Díodos e uma espectroteca de compostos fenólicos são o necessário para a referida determinação. Acresce o facto dos frutos e seus derivados apresentarem perfis fenólicos qualitativa e quantitativamente diversos e ainda de alguns frutos possuírem marcadores químicos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Padrões e Reagentes

Os padrões foram da Sigma (ST. Louis) e da Extrasynthése (Genay). Os ácidos 3- e 4-*O*-cafeoilquínico não se encontram disponíveis no mercado, por isso, foram preparados a partir do ácido 5-*O*-cafeoilquínico por transesterificação, recorrendo ao uso do hidróxido de tetrametilamónio (Clifford *et al.*, 1989a,b; Murata *et al.*, 1995). O metanol e o ácido fórmico foram obtidos da Merck (Darmstadt). A água foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Bedford).

3.2 Amostras

3.2.1 Marmeladas

Foram analisadas vinte amostras de marmelada, das quais três eram caseiras (MCA, MCB e MCC) e dezassete industriais, estas últimas provenientes de seis marcas comerciais distintas representadas pelas letras A, B, C, D, E e F.

As marmeladas caseiras foram obtidas através da cozedura de marmelos com açúcar, na proporção de 50:50 (m/m), até se atingir a textura e cor desejadas. Estas marmeladas foram confeccionadas em Outubro de 1998, com marmelos colhidos nesse mês.

As amostras industriais foram compradas em vários hipermercados da região do Porto e de Vila Nova de Gaia e, sempre que possível, foram analisados três lotes diferentes de uma mesma marca comercial. As marmeladas do primeiro lote foram compradas em Janeiro de 1998 e as dos segundo e terceiro lotes em Abril de 1999.

As amostras industriais do primeiro lote e as caseiras foram analisadas no decorrer do ano de 1998 e as restantes em 1999. Todas as marmeladas foram analisadas durante o seu período de validade e armazenadas no frigorífico até à sua análise (temperatura inferior a 5°C).

3.2.2 Geleias de Marmelo

Foram analisadas treze amostras de geleia de marmelo, das quais uma era caseira (CAS) e doze industriais, estas últimas provenientes de quatro marcas comerciais distintas representadas pelas letras A, B, C e D.

A geleia de marmelo caseira foi obtida através da cozedura dos desperdícios de marmelos usados na confecção de marmeladas (cascas e caroços) com açúcar, na proporção de 50:50 (m/m), até se obter a cor e a consistência desejadas. Por fim, o extracto obtido foi filtrado. Esta geleia foi confeccionada em Outubro de 1998, com marmelos colhidos nesse mês.

As amostras industriais foram compradas em vários hipermercados, mercearias e confeitarias da região do Porto e de Vila Nova de Gaia e foram analisados três lotes diferentes de cada uma das distintas marcas comerciais. Todas as amostras industriais foram compradas em Junho de 1999.

As geleias foram analisadas, durante o seu período de validade e no decorrer do ano de 1999. As amostras foram mantidas no frigorífico até à sua análise (temperatura inferior a 5°C).

3.3 Aparelhagem

- HPLC, marca Gilson, equipado com duas bombas, modelo 302 e 305, injektor Rheodyne, modelo 7125, provido de *loop* de 20 μ L;
- Detector de Díodos, marca Gilson, modelo 160;
- Coluna cromatográfica Spherisorb RP ODS2 (5 μ m, 25,0 \times 0,46cm);
- Membranas filtrantes Schleicher & Shull, 0,2 μ m, NL16;
- Evaporador rotativo, marca Buchi R100.

3.4 Processos de Extracção

Os compostos de cada amostra foram extraídos de duas formas: pela técnica simplificada de extracção com metanol e por extracção com uma resina de Amberlite de XAD-2.

3.4.1 Extracção Simplificada pelo Metanol

3.4.1.1 Marmeladas

A amostra de marmelada foi pesada (40g) e misturada com metanol, até extracção completa dos compostos fenólicos (reacção negativa com NaOH 20%). A solução foi filtrada e o extracto metanólico foi evaporado até à secura, num evaporador rotativo, sob pressão reduzida à temperatura de 40°C. O extracto foi redissolvido em 10 mL de metanol, filtrado e 20 μ L foram injectados no sistema cromatográfico HPLC (Andrade *et al.*, 1998a e 1999; Silva *et al.*, 1998 e 1999d,e).

3.4.1.2 Geleias de Marmelo

A amostra de geleia de marmelo foi pesada (40g) e misturada com metanol, até dissolução completa. A solução foi filtrada e o extracto metanólico foi evaporado até à secura, num evaporador rotativo, sob pressão reduzida à temperatura de 40°C. O extracto foi redissolvido em 10 mL de metanol, filtrado e 20µL foram injectados no sistema cromatográfico HPLC (Silva *et al.*, 1999f).

3.4.2 Extracção através de uma Resina de Amberlite de XAD-2

A amostra de marmelada ou geleia de marmelo foi pesada (40g) e misturada com cinco partes de água ácida (pH 2 com HCl) até fluidez completa e filtrada através de algodão para remoção das partículas sólidas. O filtrado foi passado por uma coluna (25 × 2 cm) de Amberlite de XAD-2 (Fluka Chemicals; 9 nm de diâmetro de poro, 0,3-1,2 mm de tamanho de partícula). Os compostos fenólicos presentes ficaram na coluna, enquanto que os açúcares e os outros compostos polares foram eluídos com o solvente aquoso. A coluna foi lavada com 100 mL de água ácida (pH 2 com HCl) e depois com 300 mL de água destilada. A fracção fenólica foi eluída com 300 mL de metanol. O extracto metanólico foi evaporado até à secura, num evaporador rotativo, sob pressão reduzida à temperatura de 40°C. O extracto foi redissolvido em 1,5 mL de metanol, filtrado e 20µL foram injectados no sistema cromatográfico HPLC (Andrade *et al.*, 1998a; Silva *et al.*, 1998 e 1999d,e,f).

3.5 Análise Cromatográfica dos Extractos

3.5.1 Condições Cromatográficas

Os 20 μ L de amostra foram injectados no sistema cromatográfico constituído por um HPLC Gilson, duas bombas e uma coluna Spherisorb ODS2 (25,0 \times 0,46 cm; 5 μ m de tamanho de partícula), usando como solventes água + ácido fórmico (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B). A eluição foi realizada com um fluxo de 0,9 mL/min, com o seguinte gradiente 0' – 5% B, 3' – 15% B, 13' – 25% B, 25' – 30% B, 35' – 35% B, 39' – 45% B, 42' – 45% B, 44' – 50% B, 47' – 55% B, 50' – 70% B, 56' – 75% B e 60' – 80% B (figura 5). A detecção foi feita num Detector de Díodos e os cromatogramas foram registados a 280 e 350 nm (Andrade *et al.*, 1998a e 1999; Silva *et al.*, 1998 e 1999d,e,f).

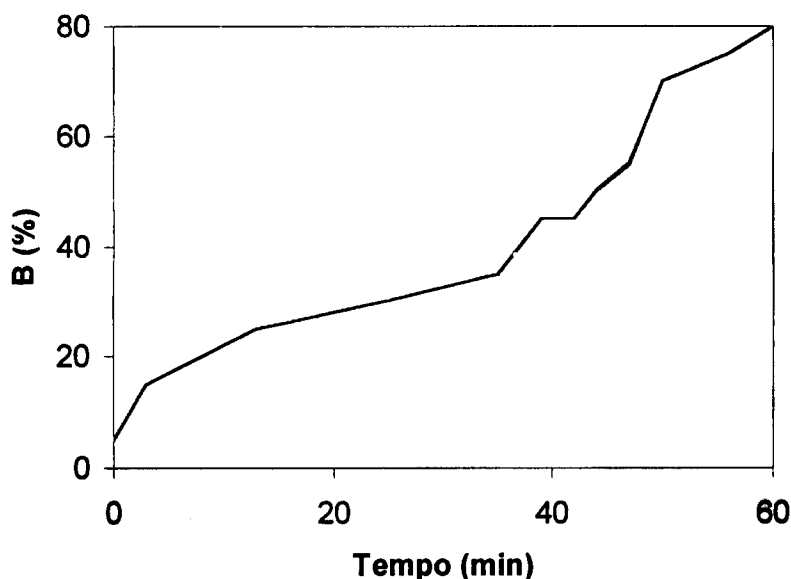


Figura 5 – Gradiente utilizado de forma a obter a melhor resolução dos compostos fenólicos.

3.5.2 Identificação

Os diferentes compostos fenólicos, o benzoato de sódio e o hidroximetilfurfural (HMF) foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção e espectros UV-Vis, na gama de comprimentos de onda de 200-400 nm, com uma espectroteca previamente compilada pelos membros do Laboratório de Farmacognosia. A pureza dos picos foi verificada utilizando o “Gilson 160 Spectra Viewer Software contrast facilities”.

3.5.3 Quantificação

A quantificação dos compostos fenólicos e do HMF foi efectuada pelo método do padrão externo, utilizando a área do pico correspondente no cromatograma, e a do benzoato de sódio a partir da equação da curva de calibração obtida.

A arbutina, o ácido gálgico, a procianidina B3, o benzoato de sódio e o HMF foram quantificados nos extractos obtidos a partir da técnica simplificada com metanol, a 280 nm, e os restantes compostos nos extractos obtidos via Amberlite de XAD-2, a 350 nm, excepto os polímeros de procianidinas que foram doseados a 280 nm. As procianidinas foram expressas em procianidina B3.

3.6. Validação do Método de Determinação do Benzoato de Sódio

3.6.1. Recuperação

A determinação das percentagens de recuperação foi realizada pelo método das adições. Para isso, adicionaram-se quantidades conhecidas de benzoato de sódio (0,010, 0,040 e 0,080 g/100g de marmelada) a três tomas de uma mesma marmelada, tendo sido efectuadas três injeções para cada nível de concentração (Andrade *et al.*, 1999). A amostra foi analisada em triplicado antes e depois da adição do conservante. A partir da quantidade de benzoato de sódio encontrada na análise por HPLC e do seu teor original, calcularam-se as respectivas percentagens de recuperação.

3.6.2 Precisão

A precisão do método analítico foi avaliada através da medição da área do pico do benzoato de sódio de uma mesma amostra após a sua injeção por seis vezes (Andrade *et al.*, 1999).

3.6.3 Linearidade

A linearidade do método foi verificada através da curva de calibração obtida da equação da recta determinada para o benzoato de sódio. A curva de calibração foi obtida a partir de determinações em triplicado de cada nível, tendo sido calculados os valores médios das áreas dos picos (unidades arbitrárias) (Andrade *et al.*, 1999).

3.6.4 Limite de Detecção

O limite de detecção foi calculado como sendo a concentração correspondente a três vezes o desvio padrão do ruído de fundo (Andrade *et al.*, 1999).

4. Resultados e Discussão

4.1 Marmeladas

4.1.1 Aspecto Geral das Amostras

De forma geral, as amostras (tabela 9) apresentavam cor castanha escura avermelhada, excepto as da marca comercial F e a MCC, que tinham cor clara. Na maioria das marmeladas industriais, verificou-se a presença de líquido à sua superfície, cuja quantidade variava conforme os lotes. No que diz respeito à textura, verificou-se que duas das amostras caseiras eram muito duras, enquanto que as da marca comercial F eram demasiado moles. Em nenhuma amostra se observou a presença de pontos negros e só numa das amostras caseiras se verificou cristalização à superfície do produto. As embalagens eram todas de plástico, podendo ter diferentes formas. Em algumas das amostras que tinham líquido acumulado, verificou-se o contacto do produto com o exterior da embalagem.

As marmeladas das marcas A, E e F eram de qualidade “extra” e a D “light”. Em todas as marmeladas industriais, na lista de ingredientes constava: polpa de marmelo, açúcar, ácido cítrico (E330) (ou ácido L(+)-tartárico (E334) na marca comercial C) e benzoato de sódio (E211) (ou ácido benzóico (E210) também na marca C). Verificou-se que nas embalagens das amostras F, também constava da lista um aditivo espessante, a carragenina (E407). Em todos os casos esteve mencionado no rótulo “preparado comg de fruto por 100g” e “teor total em açúcares deg por 100g”. Nas marmeladas de qualidade “extra” a quantidade de marmelo foi sempre igual ou superior a 50g, nas de qualidade “normal” variou entre 45 e 50g. A quantidade líquida das embalagens variou entre 400 e 450g. Em todas as embalagens observou-se “consumir de preferência antes do fim de mês/ano”, excepto na marca F em que só vinha referido o ano e na D em que também vinha referido o dia. O lote e a identificação/morada do produtor vieram sempre indicados em todos os rótulos. Só nas marcas comerciais A e D se observou a indicação das

condições de conservação: “deve conservar-se no frigorífico depois de aberto”. As embalagens das amostras D tinham a indicação do valor nutritivo por 100g.

Tabela 9 – Características das várias amostras de marmelada, industriais e caseiras.

Marmelada	Cor	Textura/ dureza	Varição da qualidade de lote para lote	Cristalização de açúcar à superfície	Presença de líquido	Tipo de embalagem
A	escura	normal	sim	não	sim	plástica (redonda)
B	escura	normal	sim	não	sim	plástica (rectangular)
C	escura	normal	sim	não	sim	plástica (rectangular)
D	escura	normal	não	não	não	plástica (rectangular)
E	escura	normal	sim	não	sim	plástica (rectangular)
F	clara	mole	sim	não	sim	plástica (quadrada)
MCA	escura	normal	---	não	não	---
MCB	escura	dura	---	não	não	---
MCC	clara	dura	---	sim	não	---

Segundo a rotulagem destes produtos, todos utilizam só uma espécie de fruto, a *Cydonia oblonga*, ou seja, o marmelo.

4.1.2 Compostos Fenólicos

4.1.2.1 Análise Qualitativa

Sob as condições descritas no capítulo dos Materiais e Métodos, os tempos de retenção dos compostos fenólicos foram os indicados nas tabelas 10 e 11. A repetibilidade do método foi elevada, no que diz respeito aos tempos de retenção e às áreas dos picos.

Para todas as amostras de marmelada, excepto para as adulteradas, ambas as técnicas de extracção conduziram ao mesmo perfil fenólico, composto por, pelo menos, oito compostos identificados (procianidina B3, ácidos 3-, 4- e 5-*O*-cafeoilquínicos, rutina, 3-*O*-galactosilquercetina, 3-*O*-xilossilquercetina e 3-*O*-ramnosilquercetina) (figura 6, 7 e 8, tabelas 10 e 11). Na figura 9 estão representados os espectros UV dos compostos fenólicos identificados nas marmeladas em estudo. Também se verificou a presença de vários compostos não identificados com espectro UV idêntico, com máximo a 269,3 nm (figura 10). A possibilidade de serem glicósidos de polímeros de procianidinas não está excluída, de acordo com estudos anteriores (Porter *et al.*, 1985), com o seu comportamento cromatográfico e o seu espectro UV. Algumas das amostras também contêm ácido gálgico (figura 7), que só é detectável nos extractos obtidos através da técnica simplificada com metanol. Verificou-se a presença da arbutina na maior parte das amostras de marmelada (figura 8, tabela 10), com a excepção das caseiras e das da marca comercial D, o que sugere adulteração por adição de pêra (Spanos e Wrolstad, 1990b; Spanos e Wrolstad, 1992; Tomás-Lorente *et al.*, 1992 e Andrade *et al.*, 1998a). O espectro UV da arbutina é apresentado na figura 11. Nenhuma das amostras apresentou as diidrochalconas 2'-*O*-xilossilglucosilfloreteína e 2'-*O*-glucosilfloreteína, consideradas marcadores químicos da maçã (Spanos *et al.*, 1990; Spanos e Wrolstad, 1992; Tomás-Lorente *et al.*, 1992 e Andrade *et al.*, 1998a), pelo

que se pode concluir que não houve falsificação destas marmeladas por adição de maçã. Na figura 12 são apresentados os espectros UV destas duas diidrochalconas.

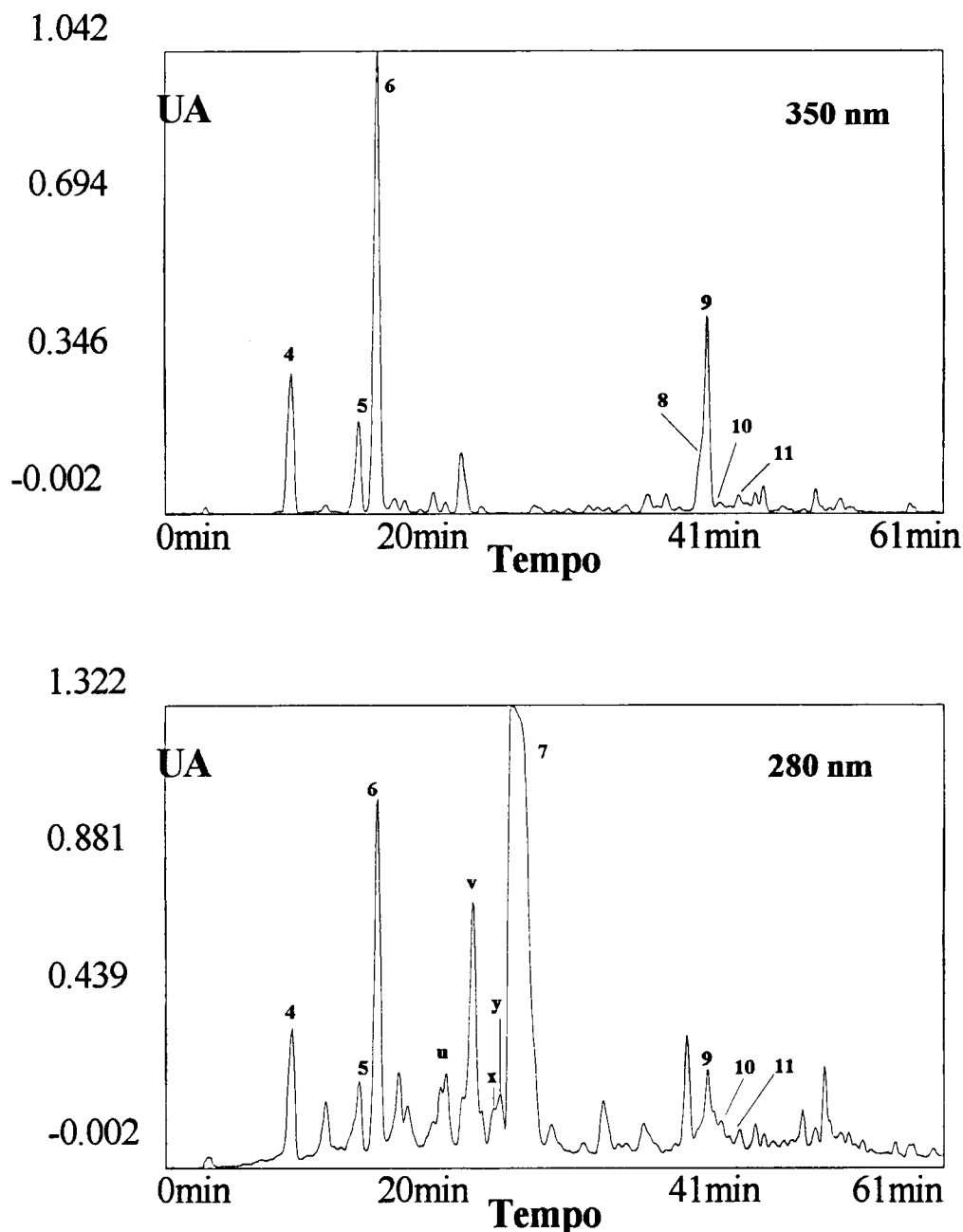


Figura 6 – Perfil fenólico de uma marmelada industrial, obtido através do processo de extracção via Amberlite de XAD-2. (4) ácido 3-*O*-cafeoilquinico; (5) ácido 4-*O*-cafeoilquinico; (6) ácido 5-*O*-cafeoilquinico; (7) benzoato de sódio; (8) rutina; (9) 3-*O*-galactosilquercetina; (10) 3-*O*-xilossilquercetina; (11) 3-*O*-ramnosilquercetina e u, v, x, y – procianidinas características do marmelo ainda não identificadas.

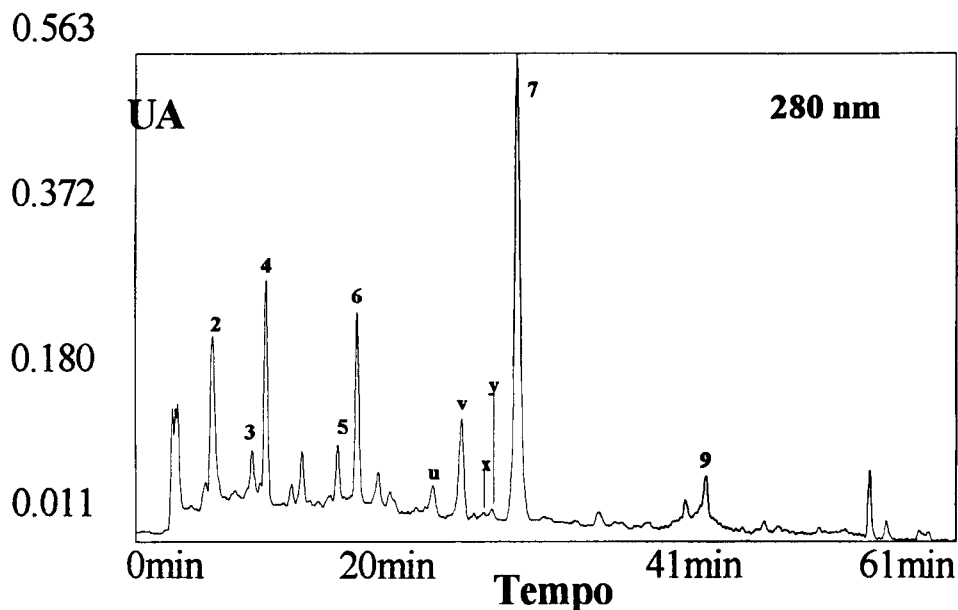


Figura 7 - Perfil fenólico de uma marmelada industrial, obtido através do processo de extração com metanol. (2) ácido gálico; (3) procianidina B3; (4) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (5) ácido 4-*O*-cafeoilquínico; (6) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (7) benzoato de sódio; (9) 3-*O*-galactosilquercetina e u, v, x, y – procianidinas características do marmelo ainda não identificadas.

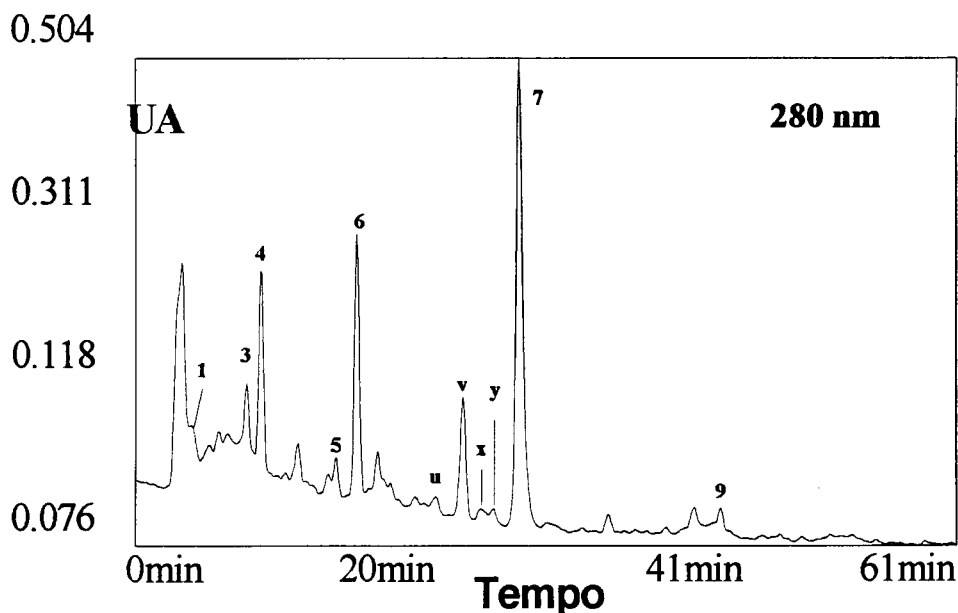


Figura 8 - Perfil fenólico de uma marmelada industrial adulterada, obtido através do processo de extração com metanol. (1) arbutina; (3) procianidina B3; (4) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (5) ácido 4-*O*-cafeoilquínico; (6) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (7) benzoato de sódio; (9) 3-*O*-galactosilquercetina e u, v, x, y – procianidinas características do marmelo ainda não identificadas.

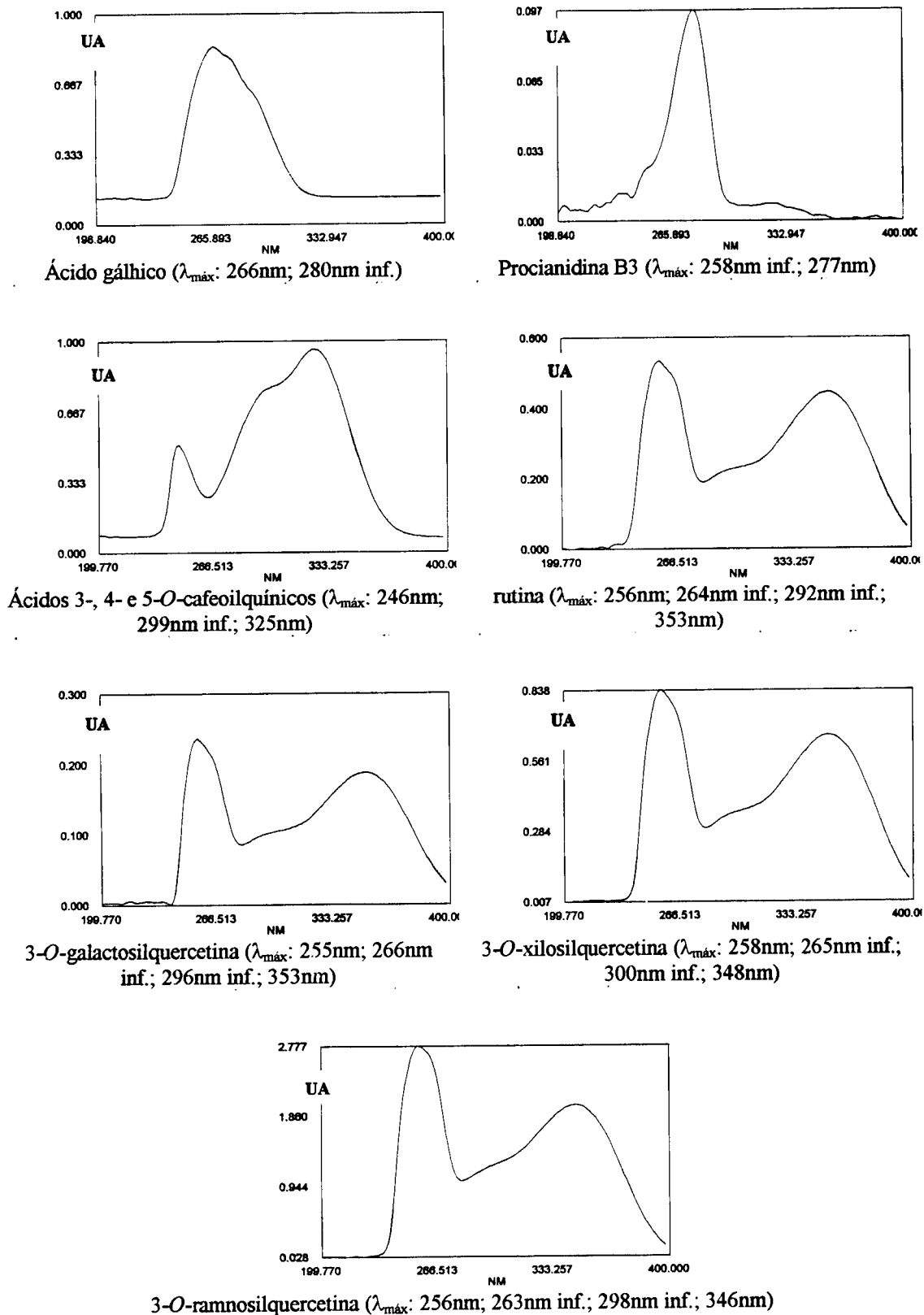


Figura 9 – Espectros UV, obtidos no Detector de Díodos, dos compostos identificados nas marmeladas.

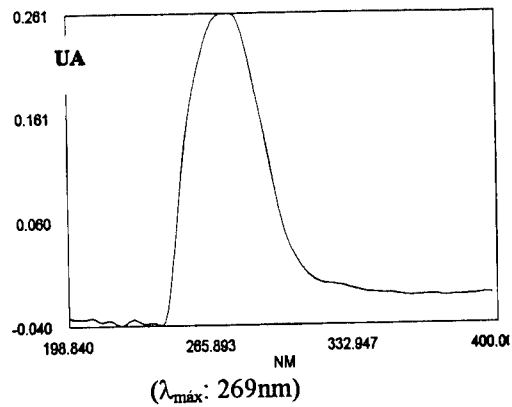


Figura 10 – Espectro UV, obtido no Detector de Díodos, dos compostos ainda não identificados nas marmeladas.

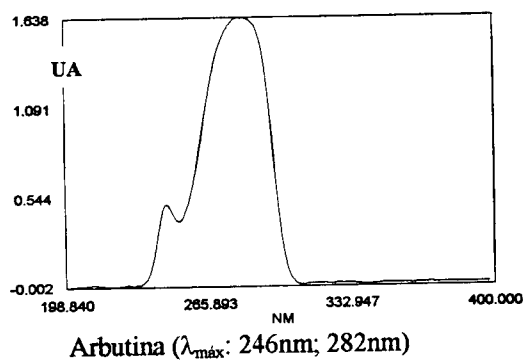
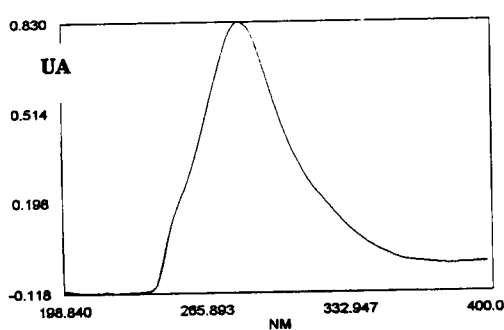
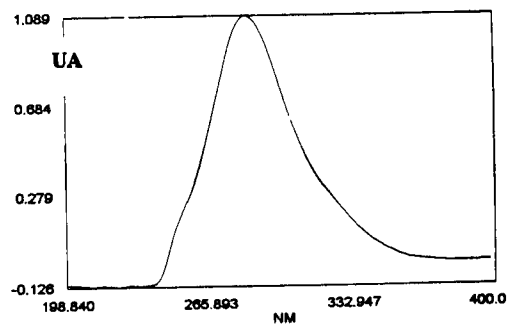


Figura 11 – Espectro UV, obtido no Detector de Díodos, da arbutina.



2'-O-xilosilglucosilfloreína ($\lambda_{\text{máx}}$: 252nm inf.; 285nm)



2'-O-glucosilfloreína ($\lambda_{\text{máx}}$: 252nm inf.; 286nm)

Figura 12 – Espectros UV, obtidos no Detector de Díodos, da 2'-O-xilosilglucosilfloreína e da 2'-O-glucosilfloreína.

4.1.2.2 Análise Quantitativa

Todas as amostras foram submetidas a dois métodos de extracção: a extracção simplificada pelo metanol e a extracção recorrendo à Amberlite de XAD-2, de forma a poder fazer-se uma selecção do melhor método de extracção de cada um dos compostos. Através do processo de extracção com Amberlite de XAD-2, de uma maneira geral, a quantidade de cada um dos compostos fenólicos no extracto foi superior. No entanto, quando este processo extractivo foi usado, a arbutina, o ácido gálgico e a procianidina B3 apresentaram uma taxa de recuperação inferior, chegando mesmo a verificar-se a não detecção destes compostos pelo Detector de Díodos. Isto pode ser devido à polaridade destes compostos, permitindo a sua eluição com os açúcares e outros compostos polares. Sendo assim, tornou-se necessário utilizar a técnica simplificada para a quantificação da arbutina (nas amostras adulteradas), da procianidina B3 e do ácido gálgico (tabelas 10 e 11).

Tanto nas marmeladas caseiras como nas industriais, o composto fenólico mais abundante foi sempre uma das procianidinas não identificadas (tabela 11). Relativamente aos flavonóis, de uma maneira geral, a 3-*O*-galactosilquercetina foi o composto presente em maior quantidade (tabela 10).

Nos diferentes lotes provenientes de uma mesma indústria verificaram-se composições diferentes em termos quantitativos, o que pode ser explicado pelo facto de haver uma grande deficiência no controlo do processo de fabrico da marmelada, nomeadamente no tempo e na temperatura de cocção. Como se sabe, os compostos fenólicos e, em especial, as procianidinas são bastante sensíveis ao calor (Spanos e Wrolstad, 1990a e Spanos *et al.*, 1990), por isso, é natural que variações no tempo e/ou temperatura de cozedura originem grandes variações na quantidade de cada composto fenólico. Para além disso, é importante não esquecer a variabilidade natural inerente aos frutos de uma mesma variedade e dentro das variedades. Outros factores, como a data de colheita, a origem geográfica, as práticas culturais, o grau de maturação do fruto e as condições de armazenamento,

podem introduzir diferenças quantitativas e qualitativas no perfil de polifenóis (Spanos e Wrolstad, 1990b). Por estes motivos, não são de estranhar estas variações entre lotes, entre marmeladas de diferentes marcas comerciais, entre marmeladas industriais e caseiras ou mesmo dentro das várias caseiras. Estas variações foram até detectáveis por simples observação das amostras que, como se descreveu anteriormente, apresentavam aspecto distinto, por vezes, mesmo de lote para lote de uma mesma origem.

Tabela 10 – Composição fenólica das amostras de marmelada (mg de composto fenólico/Kg de marmelada) obtida através do processo de extração com Amberlite de XAD-2^a.

Amostras	Arbutina* (TR 4min52s)	Ácido gálico* (TR 6min5s)	Ácido 3-O- cafeoilquínico (TR 9min55s)	Ácido 4-O- cafeoilquínico (TR 15min32s)	Ácido 5-O- cafeoilquínico (TR 16min17s)	Rutina (TR 42min1s)	3-O- galactosilqueretina (TR 42min32s)	3-O- xilosilqueretina (TR 44min32s)	3-O- ramnosilqueretina (TR 45min49s)
A1	71,6 (15,77)	—	21,1 (0,17)	5,9 (0,05)	31,0 (0,19)	0,8 (0,02)	4,1 (0,03)	0,2 (0,006)	0,1 (0,02)
A2	10,6 (1,83)	38,6 (2,21)	12,6 (1,07)	7,8 (0,84)	33,0 (2,40)	nq	6,8 (0,59)	0,2 (0,03)	0,04 (0,01)
A3	16,9 (4,26)	—	6,3 (0,38)	2,3 (0,15)	27,3 (2,15)	1,2 (0,001)	5,7 (0,41)	0,04 (0,008)	0,04 (0,005)
B1	nq	—	31,4 (2,36)	7,3 (0,34)	34,3 (1,10)	0,8 (0,03)	4,7 (0,21)	0,3 (0,009)	0,09 (SE-4)
B2	22,5 (2,77)	60,5 (0,74)	4,0 (0,16)	4,1 (0,53)	8,0 (0,03)	0,04 (3E-4)	7,6 (0,40)	0,6 (0,03)	0,5 (0,04)
B3	9,2 (3,25)	—	10,6 (0,62)	3,0 (0,22)	34,1 (2,29)	0,3 (0,03)	3,5 (0,04)	0,2 (0,03)	0,5 (0,02)
C1	159,9 (3,00)	—	32,9 (0,79)	15,5 (0,50)	75,4 (1,40)	1,4 (0,004)	6,1 (0,01)	0,1 (0,07)	0,2 (0,03)
C2	45,0 (6,67)	27,2 (4,76)	11,2 (6,40)	5,3 (0,09)	42,8 (1,33)	nq	12,4 (0,98)	0,5 (0,04)	0,03 (0,002)
C3	28,5 (6,70)	7,8 (0,49)	0,5 (0,04)	0,2 (0,03)	6,7 (0,46)	0,3 (0,03)	0,9 (0,09)	0,3 (0,06)	0,7 (0,05)
D1	—	—	19,6 (15,65)	21,8 (0,55)	99,5 (0,42)	1,9 (1,12)	11,1 (4,24)	0,8 (0,04)	0,4 (0,06)
D2	—	—	3,6 (0,29)	3,2 (0,25)	23,2 (1,21)	nq	4,8 (0,22)	0,06 (0,004)	0,03 (0,004)
E1	19,0 (1,67)	—	34,7 (0,51)	20,2 (0,25)	100,6 (7,35)	3,3 (0,09)	25,9 (0,37)	0,4 (9E-4)	0,2 (0,09)
E2	18,0 (2,69)	—	5,9 (0,71)	6,2 (0,05)	40,3 (2,54)	nq	16,3 (1,09)	0,7 (0,05)	0,08 (9E-4)
E3	37,7 (3,28)	—	0,3 (0,01)	nq	6,1 (0,63)	0,09 (SE-4)	0,2 (0,005)	0,09 (0,002)	0,4 (0,02)

^aValores expressos como a média (desvio padrão) de três determinações para cada amostra; 1, 2, 3 - lotes de cada marca comercial; nq – não quantificável;

* Arbutina e ácido gálico determinados através da extração simplificada pelo metanol.

Tabela 10 (continuação) – Composição fenólica das amostras de marmelada (mg de composto fenólico/Kg de marmelada) obtida através do processo de extração com Amberlite de XAD-2^a.

Amostras	Arbutina* (TR 4min52s)	Ácido gálico* (TR 6min5s)	Ácido 3-O- cateoiquínico (TR 9min55s)	Ácido 4-O- cateoiquínico (TR 15min32s)	Ácido 5-O- cateoiquínico (TR 16min17s)	Rutina (TR 42min1s)	3-O- galactosiquercetina (TR 42min32s)	3-O- xilosiquercetina (TR 44min32s)	3-O- ramnosiquercetina (TR 45min49s)
F1	59,3 (2,18)	—	4,4 (0,16)	2,2 (0,07)	17,5 (0,67)	0,1 (0,01)	0,9 (0,03)	0,1 (0,01)	0,03 (0,002)
F2	21,0 (2,24)	—	2,7 (0,11)	1,3 (0,08)	11,6 (0,19)	0,07 (0,001)	3,6 (0,05)	0,1 (0,02)	0,04 (4E-4)
F3	18,6 (0,09)	—	10,2 (0,21)	3,2 (0,04)	53,3 (0,29)	0,2 (0,03)	2,8 (0,12)	0,06 (8E-4)	0,1 (0,02)
MCA	—	—	7,5 (0,24)	4,5 (0,07)	29,7 (1,72)	nq	9,5 (0,17)	0,5 (0,008)	1,4 (0,07)
MCB	—	—	18,5 (0,43)	5,9 (0,06)	70,7 (3,71)	nq	22,1 (0,09)	0,1 (0,01)	0,6 (0,02)
MCC	—	—	3,4 (0,42)	1,0 (0,01)	31,9 (2,35)	0,07 (0,02)	0,1 (0,02)	0,1 (0,02)	0,1 (0,01)
Média	26,9	6,7	12,1	—	38,8	—	7,5	0,3	0,3
DP	37,32	16,31	10,83	—	28,07	—	7,07	0,23	0,34

*Valores expressos como a média (desvio padrão) de três determinações para cada amostra; 1, 2, 3 - lotes de cada marca comercial; nq – não quantificável;
* Arbutina e ácido gálico determinados através da extração simplificada pelo metanol.

Tabela 11 – Composição em procianidinas das amostras de marmelada (mg de procianidina B3/Kg de marmelada) obtida através do processo de extracção com Amberlite de XAD-2^a.

Amostras	Procianidina B3* (TR 8min25s)	Procianidina u** (TR 22min12s)	Procianidina v** (TR 24min27s)	Procianidina x** (TR 26min6s)	Procianidina y** (TR 26min33s)
A1	18,5 (3,90)	169,5 (15,83)	5,6 (0,75)	2,8 (0,28)	16,3 (1,23)
A2	nq	83,5 (8,63)	5,7 (0,95)	265,9 (19,92)	11,9 (1,51)
A3	nq	13,0 (0,28)	139,2 (2,37)	6,3 (0,12)	19,6 (0,83)
B1	76,2 (8,02)	240,0 (11,00)	22,4 (0,56)	13,0 (2,29)	605,8 (37,73)
B2	nq	36,3 (8,10)	75,2 (1,31)	3,2 (0,34)	69,9 (7,44)
B3	nq	31,1 (7,18)	115,6 (3,95)	4,1 (0,37)	13,7 (1,29)
C1	243,6 (1,19)	344,4 (35,10)	7,5 (1,98)	nq	2464,9 (639,48)
C2	318,6 (31,72)	404,6 (15,48)	16,8 (0,51)	26,3 (2,63)	35,5 (2,41)
C3	nq	20,2 (2,28)	44,6 (5,04)	439,7 (13,07)	5,1 (0,28)
D1	215,4 (31,78)	609,6 (34,38)	25,3 (1,06)	178,9 (10,19)	nq
D2	nq	210,9 (12,86)	nq	7,9 (0,56)	21,1 (1,01)
E1	234,7 (14,00)	1086,7 (74,60)	14,4 (1,53)	96,9 (86,41)	747,9 (123,14)
E2	nq	458,2 (10,97)	nq	nq	36,9 (1,09)
E3	nq	2,3 (0,07)	6,9 (0,27)	311,5 (36,13)	2,0 (0,09)
F1	nq	13,6 (0,28)	105,1 (1,80)	8,8 (0,56)	17,1 (0,10)
F2	nq	34,7 (2,26)	96,3 (7,70)	8,7 (0,24)	1,9 (0,36)
F3	nq	nq	266,7 (0,33)	13,6 (0,78)	24,5 (1,29)
MCA	nq	295,8 (8,15)	24,4 (7,84)	3,5 (0,33)	25,4 (3,36)
MCB	319,9 (81,28)	13,3 (9,63)	19,2 (5,11)	260,2 (25,68)	32,3 (0,61)
MCC	nq	3,3 (0,30)	395,4 (4,23)	17,7 (0,07)	38,8 (0,35)

*Valores expressos como a média (desvio padrão) de três determinações para cada amostra; 1,2,3 - lotes de cada marca comercial; nq – não quantificável; * Procianidina B3 determinada através da extracção simplificada pelo metanol; **u,v,x,y – procianidinas ainda não identificadas características do marmelo.

4.1.3 Benzoato de Sódio

Depois de várias tentativas de identificação de alguns picos desconhecidos, nos cromatogramas obtidos a 280 nm (figuras 6, 7 e 8), observou-se um pico correspondente ao benzoato de sódio, o conservante mais utilizado na Indústria Alimentar para conservar as marmeladas, tratando-se de um agente antimicrobiano, especialmente contra leveduras e bolores. Assim, e apesar de já existirem várias metodologias de determinação dos ácidos benzóico e sórbico e seus sais, baseadas em técnicas de HPLC (Frohlich, 1982; Ali, 1985; Lee *et al.*, 1986; Bui e Cooper, 1987 e Lee *et al.*, 1995), considerou-se de grande interesse e utilidade a validação deste método, uma vez que possibilita a determinação simultânea do perfil fenólico e a quantificação do conservante usado.

Verificou-se que, à semelhança do que aconteceu com a arbutina, o ácido gálico e a procianidina B3, o benzoato de sódio apresentou uma taxa de recuperação superior quando se usou o processo de extração com metanol do que com Amberlite de XAD-2, logo a validação do método de quantificação deste composto foi realizada recorrendo à técnica simplificada.

4.1.3.1 Validação do Método

Na figura 13 estão representados os cromatogramas obtidos para uma solução padrão de benzoato de sódio (A) e uma amostra de marmelada industrial (B). O espectro UV deste conservante é o apresentado na figura 14.

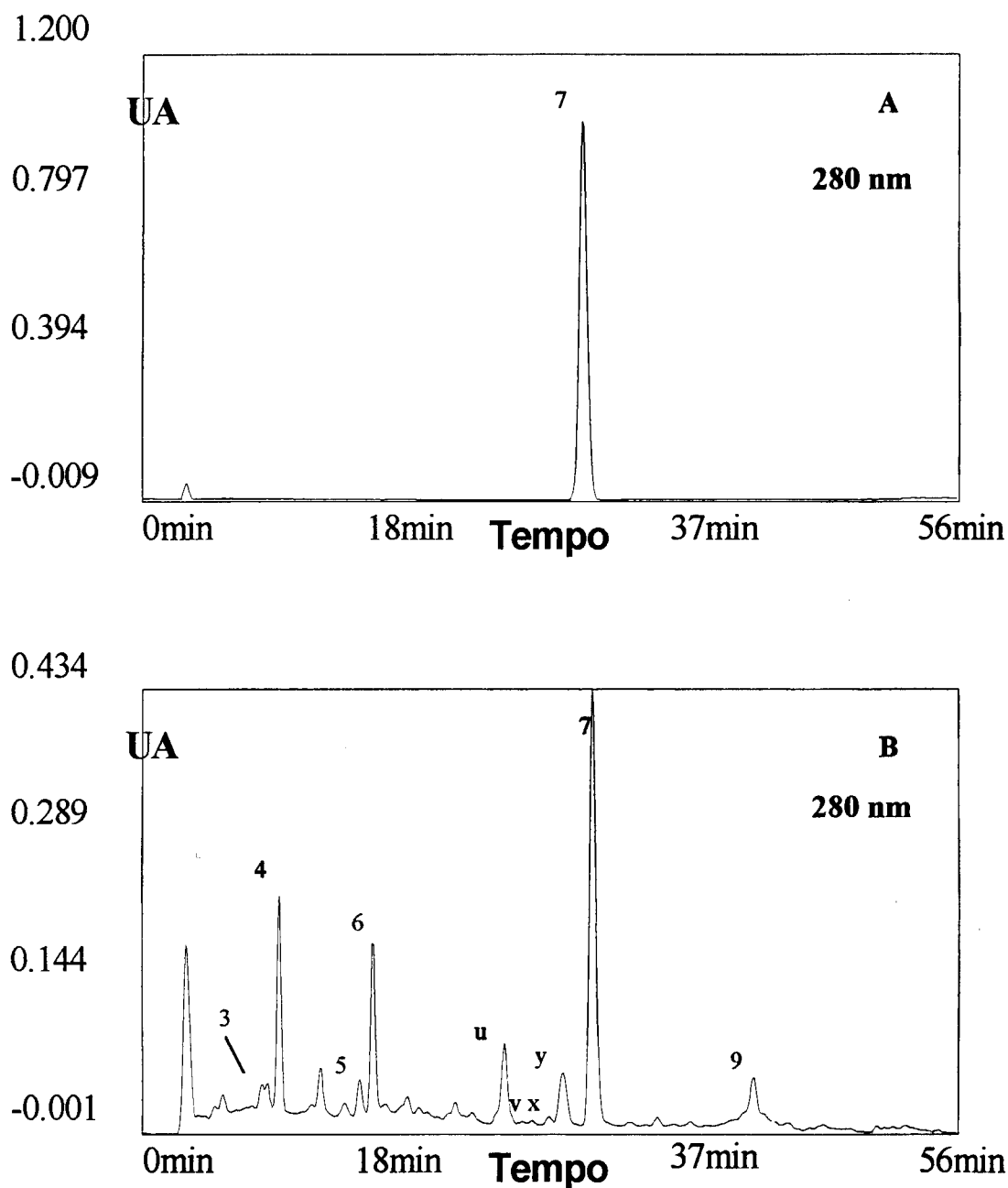
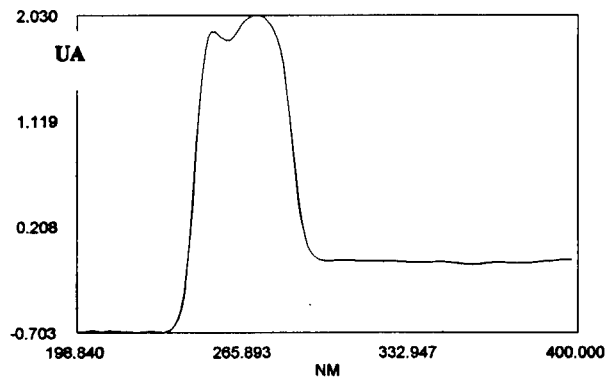


Figura 13 - Perfil de uma solução padrão de benzoato de sódio (A) e de uma marmelada industrial, obtido através do processo de extração com metanol (B). (3) procianidina B3; (4) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (5) ácido 4-*O*-cafeoilquínico; (6) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (7) benzoato de sódio; (9) 3-*O*-galactosilquercetina e u, v, x, y – procianidinas características do marmelo ainda não identificadas.



Benzoato de sódio ($\lambda_{\text{máx}}$: 250nm; 273nm)

Figura 14 – Espectro UV, obtido no Detector de Díodos, do benzoato de sódio.

4.1.3.1.1 Recuperação

Os resultados obtidos do estudo da recuperação do método encontram-se expressos na tabela 12. O método analítico apresentou uma boa recuperação, demonstrando a eficácia do processo de extracção e a exactidão do método proposto. Os valores da recuperação variaram entre os 94,7 e os 100,0%.

Tabela 12 - Recuperação do benzoato de sódio numa amostra de marmelada.

Original (g/100g)	Adicionada (g/100g)	Encontrada ^a (g/100g)	DP	CV (%)	Recuperação (%)
	0,010	0,084	0,003	3,1	100,0
0,074	0,040	0,108	0,004	3,2	94,7
	0,080	0,151	0,007	4,4	98,1

^aValor médio obtido de três determinações para cada nível de concentração.

4.1.3.1.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada através do doseamento do benzoato de sódio numa mesma amostra seis vezes. O desvio padrão foi de 0,003 e o coeficiente de variação de 2,76%, o que indica que o método é preciso.

4.1.3.1.3 Linearidade

Sob as condições experimentais descritas, obteve-se uma relação linear entre a concentração do benzoato de sódio e a absorvância no UV a 280 nm. A linearidade manteve-se na gama de concentrações de 1,6 a 2000 µg/mL. O coeficiente de correlação da curva de calibração foi superior a 0,999 e o desvio padrão das determinações de cada nível, efectuadas em triplicado, foi inferior a 2% em todos os casos. A equação da recta do benzoato de sódio foi $y = 6,7 \times 10^6 x + 76569,56$.

4.1.3.1.4 Limite de Detecção

O limite de detecção do método, calculado como sendo a concentração correspondente a três vezes o desvio padrão do ruído de fundo, foi de 0,5 µg/mL.

4.1.3.2 **Análise Quantitativa**

A quantificação do benzoato de sódio foi efectuada a partir da equação da recta obtida na curva de calibração. Como a legislação Portuguesa prevê os resultados em ácido benzóico, na tabela 13 são também apresentados os valores de benzoato de sódio expressos em g do respectivo ácido por 100g do produto final (Portaria n.º497/92 de 17 de Junho).

Tabela 13 – Teor em benzoato de sódio das diversas marmeladas industriais (expresso em g de benzoato de sódio/100g de marmelada e em g de ácido benzóico/100g de marmelada).

Amostras	Benzoato de Sódio (TR 27min45s)	Ácido Benzóico
A1	0,03 (0,001)	0,04 (0,001)
A2	0,03 (0,014)	0,04 (0,017)
A3	0,01 (0,001)	0,01 (0,001)
B1	0,07 (0,003)	0,08 (0,004)
B2	0,07 (0,002)	0,08 (0,002)
B3	0,05 (0,003)	0,06 (0,004)
C1	0,12 (0,003)	0,14 (0,004)
C2	0,13 (0,005)	0,15 (0,006)
C3	0,02 (0,001)	0,02 (0,001)
D1	1,25 (0,025)	1,48 (0,030)
D2	0,83 (0,086)	0,98 (0,101)
E1	0,03 (0,003)	0,04 (0,004)
E2	0,03 (0,001)	0,04 (0,001)
E3	0,04 (0,004)	0,05 (0,005)
F1	0,07 (0,010)	0,08 (0,012)
F2	0,07 (0,001)	0,08 (0,001)
F3	0,07 (0,006)	0,08 (0,007)
Valor Mínimo	0,01	0,01
Valor Máximo	1,25	1,48
Média	0,17	0,20
DP	0,337	0,398

^aValores expressos como a média (desvio padrão) de três determinações para cada amostra; 1,2,3 – lotes de cada marca comercial.

Como é óbvio as amostras de marmelada caseira não apresentaram este composto. Todas as amostras industriais apresentaram teores em benzoato de sódio iguais ou inferiores ao máximo permitido na legislação Portuguesa, ou seja, a 1,5 g de ácido benzóico/Kg de marmelada (Portaria n.º497/92 de 17 de Junho), com a excepção das amostras D1 e D2. Isto pode ser explicado pelo facto de se tratar de um produto “light”, com um conteúdo em açúcar inferior à das restantes marcas

comerciais, o que faz com que seja necessária uma maior quantidade de conservante para conseguir um prazo de validade idêntico ao das concorrentes. Sendo assim, utilizando este método, para além de detectarmos adulterações por adição de pêra ou maçã a marmeladas, também conseguimos verificar se existem falsificações por adição exagerada de benzoato de sódio.

4.2 Geleias de Marmelo

4.2.1 Aspecto Geral das Amostras

Em geral, as amostras (tabela 14) apresentaram cor vermelha escura acastanhada, excepto a A que era clara e a C que tinha um aspecto artificial (alaranjado). Em algumas marcas comerciais verificaram-se variações na qualidade das geleias dos diferentes lotes, nomeadamente nas marcas C e D, sobretudo devido à presença de líquido e à cristalização de açúcar à superfície. No que diz respeito à textura, não se verificaram anormalidades, excepto na marca C em que as geleias se assemelhavam bastante a gelatina. As embalagens utilizadas eram de plástico ou vidro, podendo ter diferentes formas. Verificou-se que as embalagens das marcas B e C eram pouco funcionais, uma vez que era impossível fechá-las após a utilização.

Nenhuma das geleias analisadas era do tipo “extra”. Em geral, na lista de ingredientes constava: polpa ou extracto aquoso de marmelo, açúcar, pectina (E440) e ácido cítrico (E330). Na marca comercial A em vez de açúcar utilizaram xarope de glucose, na B não usaram aditivos e na C adicionaram corantes. É de lamentar a utilização de corantes, uma vez que estes aditivos são usados unicamente para dar um aspecto atractivo aos produtos, o que neste caso nem aconteceu. Só na marca A esteve mencionado no rótulo “preparado comg de fruto por 100g” e “teor total

em açúcares deg por 100g”. A quantidade líquida variou entre 180 e 340g. Nas embalagens das geleias A e C observou-se a indicação “consumir de preferência antes do fim de mês/ano”, na marca D também vinha referido o dia e na B estava mencionado “consumir de preferência antes de 360 dias (mês/ano)”. O lote só foi indicado na geleia A, o que é muito grave uma vez que é através dele que, em caso de problemas, se pode identificar o produto. A identificação/morada do produtor veio sempre indicada em todos os rótulos. Só na marca comercial A se observaram as indicações das condições de conservação: “deve conservar-se no frigorífico depois de aberto” e do valor nutritivo por 100g de produto.

Tabela 14 – Características das várias amostras de geleia de marmelo, industriais e caseira.

Geleia	Cor	Textura	Varição da qualidade de lote para lote	Cristalização de açúcar à superfície	Presença de líquido	Tipo de embalagem
A	clara	normal	não	não	não	vidro (frasco)
B	escura	normal	não	sim	não	vidro (copo)
C	artificial (alaranjada)	gelatinosa	sim	não	sim	plástica (quadrada)
D	escura	normal	sim	sim	sim	plástica (copo)
CAS	escura	normal	---	não	não	—

A denominação de venda de todas as geleias industriais foi completada pela indicação de uma única espécie, o marmelo.

4.2.2 Compostos Fenólicos

4.2.2.1 Análise Qualitativa

Tal como aconteceu nas marmeladas, todas as amostras de geleia de marmelo foram submetidas aos dois métodos de extracção. As geleias apresentaram o mesmo perfil fenólico, composto por oito compostos identificados (procianidina B3, ácidos 3-, 4- e 5-*O*-cafeoliquínicos, rutina, 3-*O*-galactosilquercetina, 3-*O*-xilosilquercetina e 3-*O*-ramnosilquercetina) (figuras 15 e 16, tabela 15). No entanto, não se verificou a presença dos glicósidos de procianidinas características das marmeladas (figura 15), o que pode ser devido à sua destruição pela elevada temperatura (na presença de ácido) usada na confecção das geleias.

Verificou-se, em todas as amostras, a presença de HMF (figura 16), cujo espectro UV é apresentado na figura 17. O HMF resulta da decomposição dos açúcares por acção do calor e do tempo, por isso, a sua presença não é de estranhar, uma vez que o processamento térmico utilizado nas geleias é mais severo do que o usado nas marmeladas e o teor em açúcar é superior.

Não se verificou a presença nem da arbutina nem das diidrochalconas características da maçã, o que sugere que não houve adulteração por adição de pêra ou de maçã às geleias de marmelo.

O benzoato de sódio também não foi detectado, o que talvez possa ser explicado pelo facto das geleias terem na sua constituição uma maior quantidade de açúcar do que as marmeladas que, por sua vez, também funciona como um conservante.

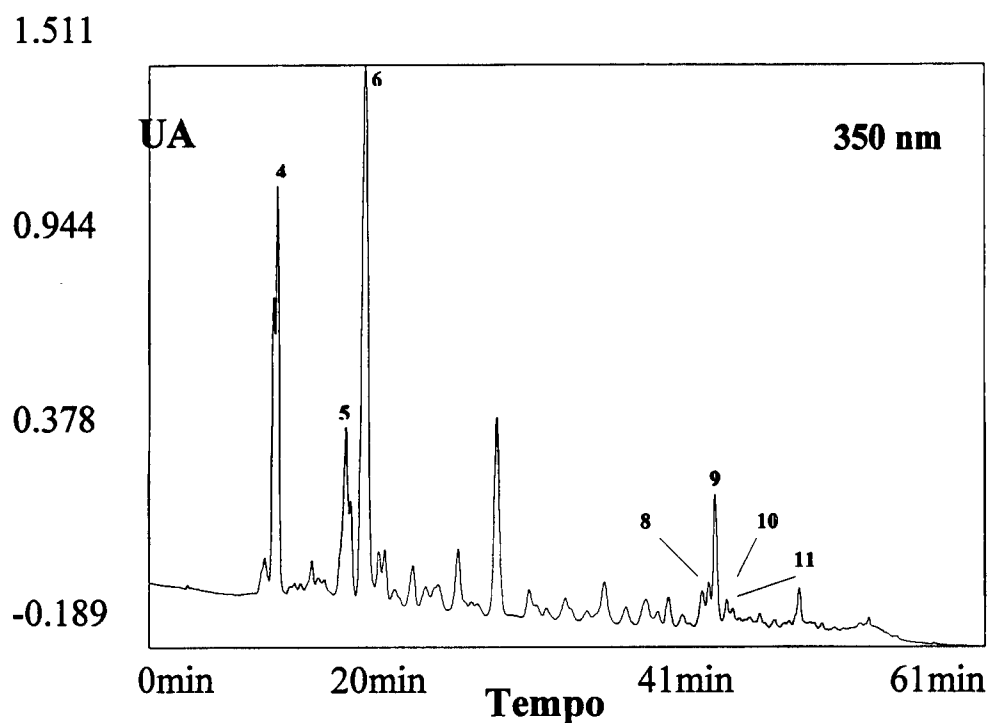


Figura 15 – Perfil fenólico de uma geleia de marmelo industrial, obtido através do processo de extração via Amberlite de XAD-2. (4) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (5) ácido 4-*O*-cafeoilquínico; (6) ácido 5-*O*-cafeoilquínico; (8) rutina; (9) 3-*O*-galactosilquercetina; (10) 3-*O*-xilosilquercetina e (11) 3-*O*-ramnosilquercetina.

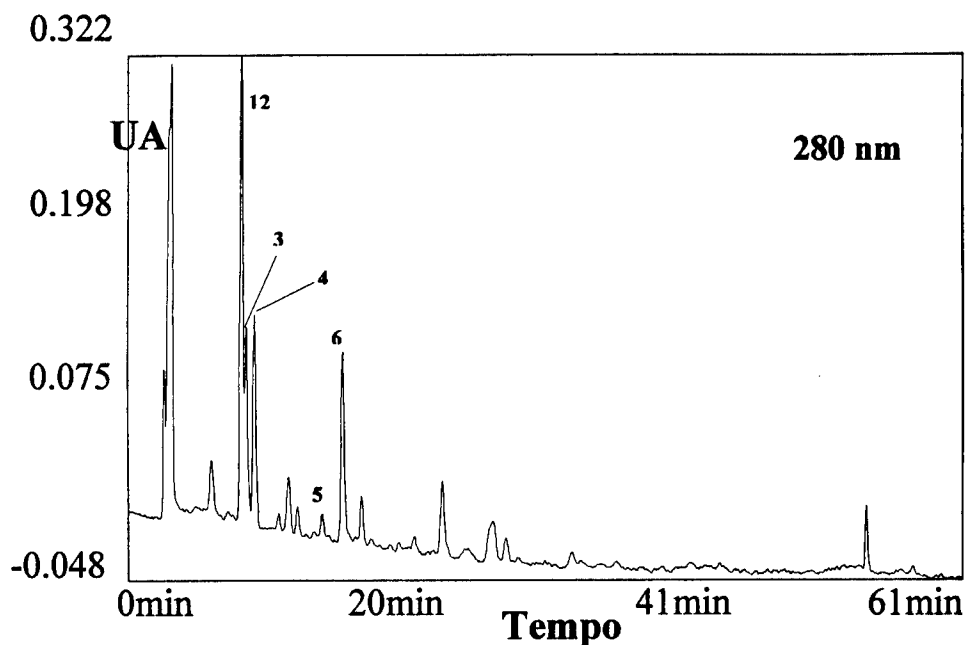


Figura 16 – Perfil fenólico de uma geleia de marmelo industrial, obtido através do processo de extração com metanol. (3) procianidina B3; (4) ácido 3-*O*-cafeoilquínico; (5) ácido 4-*O*-cafeoilquínico; (6) ácido 5-*O*-cafeoilquínico e (12) HMF.

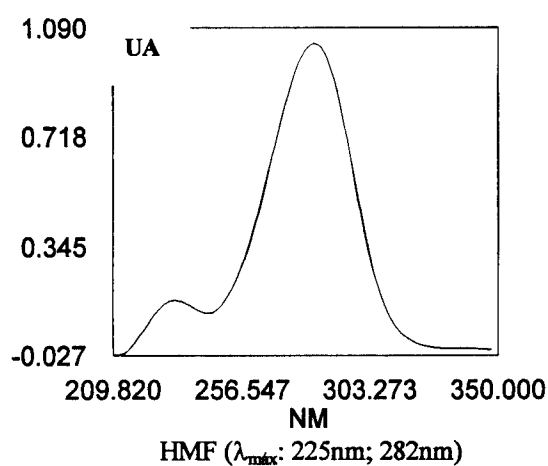


Figura 17 – Espectro UV, obtido no Detector de Díodos, do HMF.

4.2.2.2 Análise Quantitativa

Na maior parte dos casos, as geleias de marmelo apresentaram concentrações inferiores dos vários compostos fenólicos relativamente às marmeladas, com a excepção da procianidina B3, o que não é de estranhar já que a quantidade de marmelo utilizada para preparar uma mesma quantidade de marmelada é superior (Decreto-Lei n.º 97/84 de 28 de Março). Além disso, o tratamento térmico a que o fruto é submetido na confecção de geleias é mais severo do que o usado na produção de marmeladas. Este tratamento térmico também pode ser o responsável pelo elevado teor em procianidina B3 nas geleias, uma vez que os glicósidos de polímeros de procianidinas do marmelo podem, na presença do ácido cítrico, ser destruídos por hidrólise e, alguns deles, darem origem à procianidina B3.

Tanto na geleia caseira como nas industriais, o composto mais abundante foi o HMF, logo seguido da procianidina B3. O HMF foi quantificado nos extractos obtidos através da técnica simplificada com metanol, uma vez que este composto é solúvel em água, sendo uma parte dele perdida quando se preparam os extractos via Amberlite de XAD-2.

À semelhança do que aconteceu nas marmeladas, o ácido fenólico e o flavonol mais abundantes foram o ácido 5-*O*-cafeoilquínico e a 3-*O*-galactosilquercetina, respectivamente (tabela 15).

Regra geral, excepto para a procianidina B3, a rutina e a 3-*O*-xilosilquercetina, a geleia caseira teve concentrações superiores nos diferentes compostos fenólicos do que as industriais, talvez por ter um teor em marmelo superior.

Diferentes lotes de uma mesma marca comercial apresentaram diferenças em termos quantitativos, embora não tão evidentes como nas amostras de marmelada. Provavelmente, estas diferenças devem-se aos factores anteriormente apresentados na discussão dos resultados das marmeladas.

Tabela 15 – Composição fenólica das amostras de geleia de marmelo (mg de composto fenólico/Kg de geleia) obtida através do processo de extração com Amberlite de XAD-2^e.

Amostras	HMF* (TR 8min1s)	Procianidina B3* (TR 8min25s)	Ácido 3-O- cateoiquínico (TR 9min55s)	Ácido 4-O- cateoiquínico (TR 15min32s)	Ácido 5-O- cateoiquínico (TR 16min17s)	Rutina (TR 42min1s)	3-O-galactosil quercetina (TR 42min32s)	3-O-xilosil quercetina (TR 44min32s)	3-O-rannosil quercetina (TR 45min49s)
A1	109,0 (9,44)	249,9 (23,39)	4,6 (0,48)	2,4 (0,23)	17,8 (1,48)	0,02 (0,001)	0,2 (0,03)	0,2 (0,04)	0,1 (0,006)
A2	146,3 (28,31)	43,9 (9,85)	3,7 (0,10)	1,4 (0,08)	19,2 (2,38)	0,07 (0,01)	0,4 (0,04)	0,4 (0,02)	nq
A3	68,2 (1,48)	55,0 (9,94)	6,4 (0,20)	3,4 (0,12)	26,7 (0,81)	0,04 (0,0009)	0,4 (0,009)	0,3 (0,01)	0,1 (0,01)
B1	2012,0 (44,83)	819,3 (52,44)	6,8 (0,13)	4,1 (0,41)	12,8 (1,08)	nq	nq	nq	nq
B2	1292,4 (69,08)	654,0 (64,41)	1,6 (0,03)	nq	9,0 (0,29)	nq	nq	nq	nq
B3	1357,4 (30,21)	429,0 (14,92)	2,7 (0,16)	nq	8,9 (0,40)	0,09 (0,01)	0,3 (0,01)	0,08 (0,005)	0,3 (0,01)
C1	345,9 (38,98)	67,0 (3,55)	0,1 (0,01)	nq	2,2 (0,13)	nq	1,5 (0,11)	0,3 (0,02)	0,06 (0,007)
C2	369,1 (28,13)	115,1 (11,03)	0,3 (0,03)	nq	2,5 (0,06)	nq	nq	nq	nq
C3	288,9 (15,37)	94,9 (2,16)	0,6 (0,006)	nq	4,4 (0,09)	0,09 (0,009)	0,8 (0,005)	0,3 (0,004)	0,1 (0,005)
D1	221,5 (97,35)	253,4 (88,05)	2,5 (0,07)	0,7 (0,06)	6,3 (0,32)	0,2 (0,02)	1,5 (0,03)	0,2 (0,02)	0,2 (0,02)
D2	672,8 (77,66)	331,6 (52,73)	2,2 (0,23)	1,0 (0,009)	5,2 (0,61)	nq	3,9 (0,18)	0,3 (0,005)	nq
D3	746,6 (48,61)	357,0 (15,05)	nq	nq	4,8 (0,53)	nq	3,5 (0,28)	1,2 (0,10)	0,1 (0,007)
CAS	824,7 (60,36)	349,3 (7,60)	14,5 (0,17)	13,3 (0,75)	54,2 (4,01)	nq	22,4 (0,63)	0,6 (0,04)	0,4 (0,01)

Valores expressos como a média (desvio padrão) de três determinações para cada amostra; 1,2,3 - lotes de cada marca comercial; nq – não quantificável; * HMF e procianidina B3 determinados através da extração simplificada pelo metanol.

5. Conclusões

Deste estudo conclui-se, mais uma vez, que o perfil de compostos fenólicos constitui um dos mais promissores parâmetros de autenticidade nos derivados de frutos. Recorrendo a uma simples análise por HPLC acoplado a um Detector de Díodos e possuindo uma espectroteca considerável, conseguiu-se verificar se alguns derivados de marmelo, ainda pouco estudados, eram autênticos ou adulterados.

Os resultados da análise por HPLC/Detector de Díodos das amostras de marmelada, caseiras e industriais, mostraram um perfil de compostos fenólicos idêntico (procianidina B3, ácidos 3-, 4- e 5-*O*-cafeoilquínicos, glicósidos de polímeros de procianidinas não identificados, rutina, 3-*O*-galactosilquercetina, 3-*O*-xilossilquercetina e 3-*O*-ramnosilquercetina), com a predominância de um dos glicósidos de procianidinas não identificados e de ácido 5-*O*-cafeoilquínico. Em quase todas as amostras industriais verificou-se a presença de arbutina, marcador químico da pêra, o que sugere adulteração por adição deste fruto. No que diz respeito à 2'-*O*-xilossilglucosilfloreteína e à 2'-*O*-xilossilfloreteína, diidrochalconas características da maçã, estas não foram encontradas nas marmeladas industriais.

Utilizando esta metodologia foi também possível fazer a determinação simultânea de um conservante bastante utilizado na Indústria Alimentar em marmeladas, o benzoato de sódio. Este aditivo foi encontrado em todas as amostras industriais, tendo-se verificado que, em quase todas, o seu teor foi inferior ao máximo permitido pela legislação Portuguesa (1,5 g de ácido benzóico/Kg de marmelada). Fez-se a validação do método e verificou-se que se trata de uma metodologia simples, rápida, sensível, reprodutível e exacta. O limite de detecção foi de 0,5 µg/mL e o método foi preciso (DP=0,003; CV=2,76; n=6). Os valores da recuperação do benzoato de sódio oscilaram entre os 94,7 e os 100%.

Nas geleias de marmelo o perfil fenólico foi idêntico ao encontrado nas marmeladas, com a excepção da ausência dos glicósidos de polímeros de procianidinas e da presença de HMF. Estas diferenças, provavelmente, devem-se ao facto das geleias sofrerem um processamento térmico mais severo, destruindo assim os glicósidos de procianidinas e provocado a formação de HMF. Os compostos

mais abundantes nas geleias foram o HMF, a procianidina B3 e o ácido 5-O-cafeoilquínico. Não foi encontrada a presença dos marcadores químicos da pêra e da maçã, o que indica que não houve falsificação destes produtos por adição dos referidos frutos.

Utilizando este método, para além de detectarmos adulterações por adição de pêra e/ou maçã a marmeladas e geleias de marmelo, também conseguimos verificar se existem falsificações por adição exagerada de benzoato de sódio a marmeladas.

Reportando os resultados deste estudo para a realidade da Indústria Alimentar Portuguesa verifica-se que a adulteração tem sido praticada com frequência sem que, no entanto, as autoridades reguladoras façam um controlo eficiente e, muito menos, tenham sido aplicadas as respectivas punições. Por isso, é importante que haja um esforço por parte dos consumidores, das Indústrias Agro-Alimentares e, principalmente, das entidades de controlo oficial no sentido de utilizarem metodologias eficazes, como a apresentada neste trabalho, para verificar a genuinidade dos produtos alimentares, nomeadamente, dos derivados de marmelo.

6. Bibliografia

- Ali, M. S.; 1985, "Rapid quantitative method for simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, and four parabens in meat and nonmeat products by liquid chromatography", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68 (3), 488-491.
- Andrade, P. B., Carvalho, A. R. F., Seabra, R. M., Ferreira, M. A.; 1998a, "A previous study of phenolic profiles of quince, pear, and apple purees by HPLC-diode array detection, for evaluation of quince purees genuiness", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 968-972.
- Andrade, P. B., Seabra, R., Ferreira, M., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C.; 1998b, "Analysis of non-coloured phenolics in Port wines by CZE. Influence of grape variety and ageing", *Z. Lebensm Unters Forsch A*, 206, 161-164.
- Andrade, P. B., Silva, B. M., Carvalho, A. R. F., Seabra, R. M., Ferreira, M. A.; 1999, "Development of an HPLC-diode array detector method for simultaneous determination of sodium benzoate and phenolic compounds in quince jam", *J. Liquid Chromatogr. and Rel. Technol.*, 22 (7), 1069-1075.
- Bengoechea, M. L., Sancho, A. I., Bartolomé, B., Estrella, I., Gómez-Cordovés, C., Hernández, M. T.; 1997, "Phenolic composition of industrially manufactured purées and concentrates from peach and apple fruits", *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4071-4075.
- Bui, L. V. e Cooper; 1987, "Reverse-phase liquid chromatography determination of benzoic and sorbic acids in foods", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70 (5), 892-896.
- Clifford, M. N., Kellard, B., Birch, G. G.; 1989a, "Characterization of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide", *Food Chemistry*, 33, 115-123.
- Clifford, M. N., Kellard, B., Birch, G. G.; 1989b, "Characterization of caffeoylferuoylquinic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide", *Food Chemistry*, 34, 81-88.
- Decreto-Lei nº 28/84, *Diário da República*, I Série, nº 17, 1984/01/20, Portugal.
- Decreto-Lei nº 97/84, *Diário da República*, I Série, nº 74, 1984/03/28, Portugal.
- Decreto-Lei nº 170/92, *Diário da República*, I Série, nº 182, 1992/08/08, Portugal.
- Directiva do Conselho 93/77/CEE, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 1993/09/21, Bélgica.

Ferreira, M. A., Andrade, P. B., Oliveira, M. B., Ferreira, I. M., Leitão, R., Seabra, R. M.; 1997, "Os compostos fenólicos como possíveis marcadores da autenticidade dos produtos de origem vegetal", *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 1 (4), 56-63.

Frohlich, D. H.; 1982, "Optimized separation of benzoic and sorbic acid as preservatives in foodstuffs by reversed-phase HPLC", *Journal of HRC & CC*, 5, 158-160.

Garcia-Viguera, C. e Bridle, P.; 1995, "Analysis of non-coloured phenolics in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis", *Food Chemistry*, 54, 349-352.

Gonçalves, M., Lopes, T., Moás, M., Santos, V.; 1991, *Produção de marmelada com baixo teor de açúcar*. Projecto da Licenciatura em Engenharia Alimentar. Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, Porto.

Guldner, A. e Winterhalter, P.; 1991, "Structures of two new ionone glycosides from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.)", *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2142-2146.

Hammond, D. A.; 1996, "Authenticity of fruit juices, jams and preserves", *Food Authentication*, 15-59, eds. Ashurst, P. R. e Dennis, M. J., Blackie Academic & Professional, London.

Ivers, M.; 1983, *Segredos e virtudes das plantas medicinais*, Selecções do Reader's Digest, Portugal.

Jackix, M. H.; 1988, *Doces, geleias e frutas em calda*, Ícone Editora, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Jaworski, A. W. e Lee, C. Y.; 1987, "Fractionation and HPLC determination of grape phenolics", *J. Agric. Food Chem.*, 35, 257-259.

Larrauri, J. A., Rupérez, P., Calixto, F. S.; 1997, "Pineapple shell as source of dietary fiber with associated polyphenols", *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4028-4031.

Lee, H. S., Rouseff, R. L., Fisher, J. F.; 1986, "Determination of food preservatives in orange juice by reversed-phase liquid chromatography", *J. Food Science*, 51 (3), 568-570.

Lee, H. S., Ellis, P. C., Gosnell, W. W., Kirksey, S. T., Kline, L. L., Mutka, J. R., Nelson, D. B., Paisley, S. D., Sabbagh, N. K., Smith, R. D., Veja, J. A., Wade, R. L., Woodward, B. B., Zygmund, L. C.; 1995, "Liquid chromatography determination of benzoic acid in orange juice: interlaboratory study", *J. of AOAC International*, 78 (1), 80-82.

Lutz, A. e Winterhalter, P.; 1992, "Isolation of additional carotenoid metabolites from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.)", *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1116-1120.

Lutz, A. e Winterhalter, P.; 1993, "Abscisic alcohol glucoside in quince", *Phytochemistry*, 32 (1), 57-60.

Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B.; 1970, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Heidelberg: Springer-Verlag, Berlin.

Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J.; 1990, *Fruit Phenolics*, CRC Press, Inc., Florida.

Markham, K. R.; 1982, *Techniques of Flavonoids Identification*, London: Academic Press.

Murata, M. M., Okada, H., Homma, S.; 1995, "Hydroxycinnamic acid derivatives and *p*-coumaroyl-(L)-tryptophan, a novel hydroxycinnamic acid derivative, from coffee beans", *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 59 (10), 1887-1890.

Oleszek, W., Lee, C. Y., Jaworski, A.W., Price, K. R.; 1988, "Identification of some phenolic compounds in apples", *J. Agric. Food Chem.*, 36, 430-432.

Oleszek, W., Amiot, M. J., Aubert, S. Y.; 1994, "Identification of some phenolic compounds in pear fruit", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1261-1265.

Ooghe, W. C., Ooghe, S. J., Detavernier, C. M., Huyghebaert, A.; 1994a, "Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by polymethoxylated flavones", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2191-2195.

Ooghe, W. C., Ooghe, S. J., Detavernier, C. M., Huyghebaert, A.; 1994b, "Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by flavanone glycosides", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2183-2190.

Ooghe, W. C. e Detavernier, C. M.; 1997, "Detection of the addition of *Citrus reticulata* and hybrids to *Citrus sinensis* by flavonoids", *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1633-1637.

Pérez-Ilzarbe, F. J., Martínez, V., Hernández, T., Estrella, I.; 1992, "Liquid chromatography determination of apple pulp procyanidins", *J. of Liquid Chromatography*, 15 (4), 637-646.

Portaria n.º 497/92, *Diário da República*, I Série-B, nº 138, 1992/06/17, Portugal.

Porter, L. J., Foo, L. Y., Furneaux, R. H.; 1985, "Isolation of three naturally occurring O- β -glucopyranosides of procyanidin polymers", *Phytochemistry*, 24 (3), 567-569.

Riberéau-Gayon, P.; 1968, *Les Composés Phénoliques des Végétaux*, Paris: Dunod.

Schreyen, L., Dirinck, P., Sandra, P., Schamp, N.; 1979, "Flavor analysis of quince", *J. Agric. Food Chem.*, 27 (4), 872-876.

Silva, B. M.; 1999, *Parâmetros de autenticidade dos derivados de alguns frutos: polpas, doces, compotas, geleias, sumos e néctares*. Seminário do Mestrado em Controlo de Qualidade. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto.

Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Ferreira, M. A.; 1998, "Avaliação da autenticidade de marmeladas através do perfil fenólico", *XII Encontro Luso-Galego de Química - Livro de Resumos*, Comunicação 5.07.

Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Oliveira, M. B., Ferreira, M. A.; 1999a, "Marcadores químicos de genuinidade de derivados de frutos: perfil de compostos fenólicos", *Revista Portuguesa de Farmácia* (submetido para publicação).

Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Oliveira, M. B., Ferreira, M. A.; 1999b, "Verificação da autenticidade de sumos de laranja – compilação da literatura", *Revista da Alimentação Humana* (submetido para publicação).

Silva, B. M., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Oliveira, M. B., Ferreira, M. A.; 1999c, "Adulteração por adição de açúcares a sumos de frutos: uma revisão", *Ciencia y Tecnologia Alimentaria* (em publicação).

Silva, B. M., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Ferreira, M. A.; 1999d, "Phenolic compounds analysis in the evaluation of commercial quince jams authenticity", *Book of Abstracts: RequiMte (First Meeting – Porto 1999)*, P(51).

Silva, B. M., Andrade, P. B., Mendes, G. C., Valentão, P., Seabra, R. M., Ferreira, M. A.; 1999e, "Phenolic compounds analysis in the evaluation of commercial quince jams authenticity", *J. Agric. Food Chem.* (submetido para publicação).

Silva, B. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Mendes, G. C., Seabra, R. M., Ferreira, M. A.; 1999f, "Phenolic profile in the evaluation of quince jellies genuineness", *Z Lebensm Unters Forsch A* (submetido para publicação).

Simón, B. F., Pérez-Ilzarbe, J., Hernández, T., Gómez-Cordovés, C., Estrella, I.; 1992, "Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices", *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1531-1535.

- Spanos, G. A. e Wrolstad, R. E.; 1990a, "Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice", *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1565-1571.
- Spanos, G. A. e Wrolstad, R. E.; 1990b, "Influence of variety, maturity, processing and storage on the phenolic composition of pear juice", *J. Agric. Food Chem.*, 38, 817-824.
- Spanos, G. A., Wrolstad, R. E., Heatherbell, D. A.; 1990, "Influence of processing and storage on the phenolic composition apple juice", *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1572-1579.
- Spanos, G. A. e Wrolstad, R. E.; 1992, "Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage – a review", *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1478-1487.
- Stutsman, M. J. e Page, S. W.; 1997, "Fruit juice falsifications", *Authenticity and Adulteration of Food – the Analytical Approach – Proceedings of Euro Food Chem IX*, vol. 1, 145-150, Swiss Society of Food and Environmental Chemistry, Switzerland.
- Tomás-Barberán, F. A., Garcia-Viguera, C., Nieto, J. L., Ferreres, F., Tomás-Lorente, F.; 1993, "Dihydrochalcones from apple juices and jams", *J. Food Chemistry*, 46, 33-36.
- Tomás-Lorente, F., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.; 1992, "Phenolic compounds analysis in the determination of fruit jam genuiness", *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1800-1804.
- Tommasi, N., Piacente, S., Simone, F., Pizza, C.; 1996, "Constituents of *Cydonia vulgaris*: isolation and structure elucidation of four new flavonol glycosides and nine new α -ionol-derived glycosides", *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1676-1681.
- Umano, K., Shoji, A., Hagi, Y., Shibamoto, T.; 1986, "Volatile constituents of peel of quince fruit, *Cydonia oblonga* Miller", *J. Agric. Food Chem.*, 34, 593-596.
- Vallés, B. S., Victorero, J. S., Alonso, J. J. M., Gomis, D. B.; 1994, "High-performance liquid chromatography of the neutral phenolic compounds of low molecular weight in apple juice", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2732-2736.
- van Gorsel, H., Li, C., Kerbel, E. L., Smits, M., Kader, A. A.; 1992, "Compositional characterization of prune juice", *J. Agric. Food Chem.*, 40, 784-789.
- Volák, J. e Stodola, J.; 1990, *Plantas medicinais*, Editorial Inquérito, Portugal.

Wade, R. L., Kirksey, S. T., Lee, J. A.; 1992, "New analytical methods in the USA for detecting fruit juice adulteration", *Flussig. Obst.*, 59 (5), 62-72.

Winterhalter, P., Harmsen, S., Trani, F.; 1991, "A C₁₃-norisoprenoid gentiobioside from quince fruit", *Phytochemistry*, 30 (9), 3021-3025.

Winterhalter, P. e Schreier, P.; 1988, "Free and bound C₁₃ norisoprenoids in quince (*Cydonia oblonga*, Mill.) fruit", *J. Agric. Food Chem.*, 36, 1251-1256.

