

Estudo de méis monoflorais incluindo casos particulares: méis de Alfarroba, Medronheiro, Poejo e Tomilho

Ricardo Jorge Paiva Melo

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por

Prof^a Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Prof^o Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

**Bragança
2016**



Estudo de méis monoflorais incluindo casos particulares: méis de Alfarroba, Medronheiro, Poejo e Tomilho

Ricardo Jorge Paiva Melo

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar*

Orientado por

Prof^a Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Prof^o Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

**Bragança
2016**

Agradecimentos

De uma forma simples e humilde deixo aqui os meus agradecimentos a várias pessoas que contribuíram para que esta dissertação se concretizasse.

À Professora Doutora Letícia Estevinho pelo apoio incondicional que manteve até ao final do trabalho, para além de uma excelente, preocupada e exigente orientadora é realmente um enorme sere Humano que me fez evoluir como pessoa, sinto-me agora mais capaz e mais confiante das minhas capacidades.

Ao Professor Doutor Luís Dia, pela disponibilidade e acompanhamento ao longo de todo o tempo de trabalho, muitas vezes em horas tardias e em dias considerado dias de descanso (Domingos e Feriados), incansável com um ritmo de trabalho e uma energia motivacional única que me manteve sempre motivado, mesmo em situações bastante complicadas.

A todas as funcionárias e colegas do Laboratório de Microbiologia, pela disponibilidade e pela entreajuda na hora da troca de conhecimentos.

À minha família, pai e mãe, por serem o meu pilar de sustentação emocional ao ponto de nem sentir a subcarga e o esforço da realização da dissertação, além do trabalho em paralelo e da vida do dia a dia.

Humildade, apoio, exigência, confiança, acompanhamento, ritmo de trabalho, motivação e entreajuda, são as chaves para a realização pessoal e profissional.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo global efetuar um estudo sobre características físico-químicas de méis monoflorais Portugueses de forma a contribuir para o estudo experimental de caracterização dos méis de alfarroba (*Ceratonia siliqua*), medronheiro (*Arbutus unedo*), poejo (*Mentha pulegium*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (méis que ainda não foram objeto de estudos). Os outros méis monoflorais incluídos neste estudo foram: Castanheiro (*Castanea sativa*), Echium (*Echium vulgare*), Eucalipto (*Eucalyptus melliodora*), Laranjeira (*Citrus sinensis*), Rosmaninho (*Rosmarinus officinalis*) e Urze (*Ericaceae*). Os parâmetros físico-químicos avaliados em cada amostra de mel foram: cor, pH, acidez total, humidade, condutividade elétrica, teor em cinzas, HMF, diástase, açúcares redutores, teores em fenóis e flavonoides.

Das 25 amostras de mel estudadas, somente 21 das amostras foram confirmadas como sendo de méis monoflorais, através da análise polínica. Também se verificou uma grande variação no perfil polínico, o que justificou a elevada variação experimental encontrada nas características físico-químicas dos méis analisados. As cores dos méis foram usadas para estabelecer a ordem de apresentação dos méis e proceder à avaliação dos parâmetros físico-químicos analisados. Em geral, os méis apresentaram qualidade físico-química com exceções, em valores de pH em 5 méis e valor de HMF, num mel. De salientar que para os méis de alfarroba, medronheiro, poejo e tomilho não existem parâmetros mínimos e máximos legais, pelo que a avaliação global dos resultados obtidos para estes méis não foi possível.

Para o estudo global dos resultados físico-químicos usou-se a análise de agrupamentos estatísticos (MDS, “multidimensional scaling”) onde se verificou que as variações na cor do mel podem ser maioritariamente atribuídas à elevada percentagem associada ao seu pólen mais predominante. Por outro lado, as diferenças dos méis no perfil polínico, representado pelo segundo pólen mais predominante, permitem justificar as variações encontradas nas propriedades físico-químicas dos méis. Os resultados mostraram que os méis de alfarroba, poejo e tomilho são semelhantes nas variáveis físico-químicas analisadas, enquanto que as dos méis de medronheiro se aproximaram principalmente dos méis com o pólen predominante de *Erica*.

As análises microbiológicas mostraram que as amostras não apresentaram qualquer contaminação patogénica (ausência de contaminações com *Staphylococcus aureus*, Coliformes totais, *Escherichia coli*, *Clostridium sp* e *Salmonella sp.*) e tiveram níveis baixos de presença dos microrganismos Aérobios Mesófilos e Bolores/Leveduras, ou seja, os méis estudados demonstraram qualidade ao nível microbiológico.

Palavras-chave: mel, alfarroba, medronheiro, poejo, tomilho, cor, pH, acidez total, humidade, condutividade elétrica, teor em cinzas, HMF, diástase, açúcares redutores, teores em fenóis eflavonoides, MDS (“multidimensional scaling”), análises microbiológicas.

Abstract

The objective of this work was to study the physicochemical characteristics of Portuguese monofloral honeys in order to contribute to the experimental characterization of the honeys of carob (*Ceratonia siliqua*), Arbutus (*Arbutus unedo*), squaw mint (*Mentha pulegium*) and thyme (*Thymus vulgaris*) (honeys that have not yet been studied). The other monofloral honeys included in this study were chestnut (*Castanea sativa*), echium (*Echium vulgare*), eucalyptus (*Eucalyptus melliodora*), laranjeira (*Citrus sinensis*), rosmaninho (*Rosmarinus officinalis*) and erica (*Ericaceae*). The physical-chemical parameters evaluated in each sample of honey were: color, pH, total acidity, humidity, electrical conductivity, ash content, HMF, diastase, reducing sugars, phenol and flavonoid contents.

From the 25 samples of honey studied, only 21 of the samples were confirmed as monofloral honey, through pollen analysis. There was also a great variation in the pollen profile, which justified the high experimental variation found in the physicochemical characteristics of the honeys analyzed. The colors of the honeys were used to establish the order of honeys presentation and to proceed to the evaluation of the physicochemical parameters analyzed. In general, the honeys presented physical-chemical quality with exceptions, in pH values in 5 honeys and HMF value, in one honey. It should be noted that for the honeys of carob, arbutus, squaw mint and thyme there are no legal physicochemical minimum and maximum limits, so the overall evaluation of the results obtained for these honeys was not possible.

A multidimensional scaling (MDS) was used for the global study of physicochemical results, where it was found that variations in honey color may be attributed mainly to the high percentage associated with its most predominant pollen. On the other hand, the differences of the honeys in the pollen profile, represented by the second most predominant pollen, allow to justify the variations found in the physicochemical properties of the honeys. The results showed that carob, squaw mint and thyme honeys are similar in the analyzed physicochemical variables, while those of the arbutus honeys were mainly close to the honeys with the predominant pollen of Erica.

Microbiological analyzes showed that the samples did not present any pathogenic contamination (absence of contaminations with *Staphylococcus aureus*, Total Coliforms, *Escherichia coli*, *Clostridium sp* and *Salmonella sp*) and had low levels of presence of the

Aerial Mesophilic and Mold/Yeast microorganisms, meaning that the honeys studied showed microbiological quality.

KeyWords: Honey, carob, strawberry, poejo, thyme, color, pH, total acidity, moisture, electrical conductivity, ash content, HMF, diastase, reducing sugars, efflavonoid phenols, MDS (multidimensional scaling), microbiological analyzes

Índice

Resumo	ii
Abstract	iv

Capítulo I - Introdução

1.1 - Importância comercial e utilização do mel.....	1
1.2 - Produção do mel pelas abelhas	2
1.3 - Tipos de mel.....	2
1.4 - Pólen.....	3
1.5 - Composição geral do mel	3
1.6 - Parâmetros de qualidade do mel	4
1.6.1 - Teor de açúcares.....	5
1.6.2 - Teor de água.....	5
1.6.3 - Teor de matérias insolúveis.....	6
1.6.4 - Condutividade elétrica	6
1.6.5 - Ácidos livres	7
1.6.6 - Índice diastásico	7
1.6.7 - Teor de Hidroximetilfurfural	8
1.7 - Propriedades do mel.....	10
1.7.1 - Cor.....	10
1.7.2 - Compostos Voláteis	11
1.7.3 - Compostos fenólicos.....	12
1.7.4 - Microbiota.....	13

Capítulo II - Material e métodos

2.1 - Amostras de mel	15
2.2 - Análises polínicas	15
2.3 - pH.....	16
2.4 - Acidez	16
2.5 - Condutividade Elétrica	16
2.6 - Teor de Cinzas	17
2.7 - Humidade.....	17
2.8 - Cor.....	17
2.9 - Açúcares Redutores	18
2.10 - HMF	18
2.11 - Índice diastásico.....	19
2.12 - Teor em fenóis	20
2.13 - Teor em flavonóides	20
2.14 - Análises Microbiológicas	21
2.14.1. Preparação da amostra.....	21
2.14.2. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos.....	21
2.14.3. Contagem de bolores e leveduras.....	22
2.14.4. Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	22
2.14.5. Pesquisa de esporos de Clostrídeos sulfito-redutores.....	23
2.14.6. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.14.7. Isolamento e identificação de bolores e leveduras	23
2.14.8. Contagem de <i>Salmonella sp.</i>	24
2.15 – Métodos estatísticos	24

Capítulo III - Resultados e discussão

3.1 - Amostragem.....	27
3.2 - Análises Polínicas.....	28
3.3 – Caracterização Físico-Química.....	32
3.3.1 - Cor.....	32
3.3.2 - pH.....	34
3.3.4 – Acidez.....	35
3.3.5 – Humidade.....	36
3.3.6 – Cinzas totais e Condutividade elétrica.....	38
3.3.7 - Índice diastásico.....	39
3.3.8 – HMF.....	40
3.3.9 – Conteúdo em compostos fenólicos.....	41
3.3.10 – Conteúdo em flavonoides.....	43
3.3.11 – Açúcares Redutores.....	44
3.4 – Análise de agrupamentos estatísticos.....	46
3.5 – Análises microbiológicas.....	49
3.6 – Conclusão.....	52

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
--	-----------

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Escala Pfund da cor do mel.....	11
Tabela 2 - Identificação das amostras de mel de acordo com a origem floral presente no rótulo	27
Tabela 3 - Identificação de espécies botânicas perante as siglas	29
Tabela 4 - Perfil polínico de cada amostra de mel, analisados.....	30
Tabela 5 – Classificação do tipo floral do mel segundo a análise polínica e identificação das amostras baseada nos pólenes das duas espécies predominantes.....	31
Tabela 6 – Amostras de mel separadas pela informação do rótulo, respectivas repetições e contagem de microrganismos.....	33
Tabela 7 – Resultados das análises microbiológicas.....	50

Índice de Figuras

Figura 1 – Diferentes grãos de pólen.....	3
Figura 2 – Formação de HMF e de 5-HMF a partir da frutose.....	9
Figura 3 – Escala de cores padrão do mel e valores mm Pfund.....	10
Figura 4 – Esquema resumo dos compostos fenólicos mais abundantes no mel.....	13
Figura 5 – Ilustração gráfica da % de pólenes.....	29
Figura 6 – Cor dos méis estudados na escala mm Pfund.....	32
Figura 7 – Valores de pH de cada amostra de mel.....	35
Figura 8 – Valores de acidez (meq/kg de mel) de cada amostra de mel.....	36
Figura 9 – Valores de humidade (%) presente em cada amostra de mel.....	37
Figura 10 – Valores de condutividade (10^{-4} S cm^{-1}) presente em cada amostra de mel.....	39

Figura 11 – Valores de índice diastásico (mg/g/min) de cada amostra de mel.....	40
Figura 12 – Valores de HMF (mg/L) em cada amostra de mel	41
Figura 13 – Conteúdo em compostos fenólicos (mg de GAE/100g) de cada amostra de mel.....	42
Figura 14 – Conteúdo em compostos flavonoides (mg de GAE/100g) de cada amostra de mel.....	44
Figura 15 – Açúcares redutores (%) em cada amostra de mel.....	45
Figura 16 – Representação bi-dimensional do modelo MDS obtido usando três legendas: os dois pólenes predominantes, a classificação do mel em mono/multifloral e a cor em unidades de mm de PFund.....	48
Figura 17 - Valores de contagem (UFC/g) dos microrganismos presentes nas amostras de mel.....	51

Capítulo I

Introdução



1 - Definição de mel

De acordo com o Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, o mel é uma “substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* (sp. Ibérica) a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções doces de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas as abelhas recolhem e transformam estes produtos e por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia”.

1.1- Importância comercial e utilização do mel

Portugal usufrui de um clima temperado, com influência mediterrânica, propício a apicultura (Casaca, 2012). As características peculiares do mel nacional são bastante apreciadas devido à qualidade e genuinidade do produto sendo exportado em 2015 para a Espanha (47,6%), Alemanha (16.6%), França (12%), Bélgica (7,9%), Angola (5,1%), Estado Unidos da América (3,5%), Irlanda (1%) e outros Países com valores percentuais abaixo de 1%, com um total de mel exportado de 2,916 toneladas (http://www.trademap.org/tradestat/Country_SelProductCountry.aspx?nvpm=1|620|||0409||4|1|1|2|1|1|2|4|1).

O seu consumo está diretamente ligado à alimentação humana, quer do produto in natural, quer como ingrediente em várias preparações culinárias, particularmente, em produtos de pastelaria e na preparação de bebidas (Olaitan *et al.*, 2007) é também utilizado como conservante alimentar (Ferreira *et al.*, 2009).

O seu potencial para efeitos terapêuticos tem sido evidenciado recentemente em vários estudos científicos, onde a atividade antioxidante é uma das funções fisiológicas mais importantes nos alimentos, devido à sua proteção contra os agentes oxidativos nos organismos vivos, que resultam na prevenção de várias doenças, como cancro, doenças cardiovasculares e diabetes (Nagai *et al.*, 2006, Bertoneclj *et al.*, 2007).

O mel tem sido usado como medicamento durante milhares de anos para o tratamento de doenças respiratórias, infeções gastrointestinais, queimaduras, feridas infetadas e úlceras (Mundo *et al.*, 2004, Küçük *et al.*, 2007; Basualdo *et al.*, 2007)

Este produto apícola é também largamente utilizado em cosmética.

1.2 - Produção do mel pelas abelhas

O néctar de cada espécie floral varia pois, por exemplo, ao nível dos açúcares maioritários foi verificado que os néctares podem conter sacarose pura, uma mistura de 3 açúcares (sacarose, glicose e frutose) ou apenas os dois monossacarídeos (glicose e frutose) (Küçük *et al.*, 2007; Sodré *et al.*, 2007). O néctar serve de principal alimento da colmeia.

A primeira fase de transformação do néctar em mel ocorre no pré-estômago das abelhas pela adição de enzimas (invertase/sacarase) que fragmentam a sacarose em frutose e glicose. Na segunda fase, designada de trofilaxia, há passagens sucessivas do mel de umas abelhas para outras, sofrendo assim mais transformações enzimáticas através de fluidos salivares e de secreções das glândulas da faringe (Huidobro *et al.*, 1995) transformando o concentrado em açúcares simples.

Após a formação do mel, este é depositado numa célula hexagonal de um dos favos), que são feitos de cera, uma substância segregada pelas abelhas obreiras através de oito pequenas glândulas de cera situadas na parte inferior do abdómen (Cramp, 2008; Gary, 2010).

As ceras são importantes no controlo da humidade do mel. De facto, quando é depositado nas células contem entre os 30 e 40% de humidade, posteriormente a eliminação do excesso é contínua até à selagem dos favos (operculação), altura em que a humidade do produto rondará os 20% (PAN 2011- 2013, Bogdanov, 2009).

1.3 - Tipos de mel

Segundo o Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, os méis podem ser divididos consoante a sua origem e o modo de produção e/ou de apresentação.

O mel obtido a partir do néctar de plantas é chamado de mel de néctar ou mel de flores e o mel obtido a partir de excreções de insetos sugadores de plantas (hemíptera) mel de melada. Conforme o modo de produção ou de apresentação, o mel pode ser classificado em mel em favos, mel com pedaços de favos, mel escorrido, mel centrifugado, mel prensado ou mel filtrado.

Através da contagem e identificação dos diferentes tipos de pólen é possível diferenciar méis monoflorais de méis multiflorais (Finola *et al.*, 2007). Entende-se como monofloral um mel com pólen exclusivo de um tipo floral, mas isso é impossível, pois contem sempre percentagens de outros pólenes. Para considerar um mel monofloral, este deve possuir pelo

menos 45% desse pólen, embora isto não seja taxativo, ou seja, temos que atender ao tipo floral considerado. Exemplo de exceções, o mel de castanheiro tem de possuir pelo menos 90% de grãos de pólen de *Castanea* para ser monofloral (Anklam, 1998); o mel de Lavandula, deve ter uma percentagem mínima de 15% de grãos de pólen da espécie *Lavandula sp.* (Russo-Almeida e Paiva, 1996; Maia *et al.*, 2003).

O mel multifloral tem grãos de pólen de várias espécies florais, as quais não se apresentam em percentagens significativas para adquirir características predominantes de uma determinada planta.

1.4 - Pólen

O pólen é produzido pelo órgão sexual masculino das flores das plantas mais evoluídas, as anteras situadas no extremo dos estames. A função do polinizador como a abelha é transferir os grãos de pólen das anteras para o estigma que é a parte do órgão sexual feminino das flores para que se realize a fecundação, desta forma sexuada.

Os grãos de pólen são microscópicos (tamanhos variam entre 0,01mm a 0,2mm) e têm formas variáveis e características próprias consoante a espécie vegetal.

Exemplos de estruturas diferentes de pólen:



Fig.1 Diferentes grãos de pólen

A sua identificação no mel baseia-se na sua morfologia, através da análise da sua estrutura por um microscópio ótico.

O pólen apícola resulta da aglutinação dos grãos de pólen das flores efetuada pelas abelhas, mediante acréscimo de substâncias salivares e pequenas quantidades de néctar ou mel (Almeida D., 2007).

1.5 - Composição geral do mel

A composição do mel varia com as características químicas adquiridas, depende da origem botânica, do clima onde é produzido, da localização (latitude/altitude), das condições

ambientais e sazonais, e do apicultor perante os processos usados no modo de produção, elaboração e armazenamento (Azeredo *et al.*, 2003; Küçük *et al.*, 2007).

Entre os compostos presentes no mel, os açúcares são os mais encontrados, destacando-se os monossacarídeos frutose e glucose que representam aproximadamente 95% do peso seco do mel (Bogdanov, 2010). O segundo componente mais importante é a água. A atividade da água (a_w) é um fator importante para prevenir o crescimento de microrganismos. No mel com alto teor de água, algumas leveduras podem multiplicar-se causando a sua deterioração e, por isso, para impedir o crescimento microbiano a a_w deve ser baixa, em menor quantidade, o mel possui:

- proteínas, principalmente enzimas (por exemplo a invertase, diástase também designada por amilase, glucose oxidase, catalase e fosfatase ácida) (Finola *et al.*, 2007). No mel podem encontrar – se diferentes aminoácidos, embora na sua maioria seja a prolina, aminoácido adicionado ao mel pelas abelhas (Bogdanov *et al.*, 2004) possui também aminoácidos livres como tiamina, riboflavina, niacina.

- ácidos orgânicos e compostos fenólicos (flavonoides, taninos e ácidos fenólicos) são compostos responsáveis por conferir acidez ao mel e por contribuírem para o seu sabor característico (Bertoncelj *et al.*, 2007).

- sais minerais com níveis que dependem das origens botânica, geográfica e condições climáticas (Pohl, 2009) do mel produzido. Os elementos mais abundantes são o cálcio, magnésio, fósforo, potássio, crómio, selénio e zinco.

1.6- Parâmetros de qualidade do mel

O mel atualmente é um produto de elevado valor económico quando comparado com quaisquer outros adoçantes disponíveis no mercado e, por isso, para satisfazer o mercado ao nível da procura/oferta, torna-se um produto sujeito a adulterações (Sivakesava e Irudayaraj, 2002). Sendo considerado um produto de origem natural, o Codex Alimentarius estabelece requisitos de qualidade que o mel deve cumprir, para que a autenticidade do produto seja garantida e o consumidor não seja enganado.

Os critérios acerca da composição do mel natural definidos pelo Codex Alimentarius no Decreto-Lei n.º 131/85, de 29 de Abril são:

1.6.1 - Teor de açúcares

O teor de frutose e glucose (total dos dois) deve ser no mínimo de 60g/100g no mel de néctar e no mel de melada de 45g/100g.

Em relação ao teor de sacarose, em geral, não deve ultrapassar o máximo de 5g/ 100g de mel. Está referenciado que o mel com predominância do pólen de *Robinia pseudoacacia* (falsa acácia), *Medicago sativa* (luzerna ou alfalfa), *Banksia menziesii* (Mensies Banksia), *Hedysarum* (hedisaro), *Eucalyptus camadulensis*, *Eucryphia lucida*, *Eucryphia milliganii* e *Citrus spp.* (citrinos), poderá conter no máximo 10g/100g de mel. O mel de *Lavandula spp.*(rosmaninho, alfazema) e *Borago officinalis* (borragem), poderá ter no máximo 15g/100g de mel (Decreto-Lei n.o 131/85, de 29 de Abril).

Os teores em açúcares no mel influenciam as características do mel ao nível da viscosidade, densidade, cristalização e dos valores energéticos.

A relação frutose/glucose dependendo da origem floral interfere na avaliação sensorial do mel pois, a frutose é mais doce e mais solúvel do que a glucose; os méis com maior razão frutose/glucose tornam-se mais doces e mantêm-se líquidos durante um maior período de tempo. No mel é possível isolar muitos outros açúcares em valores mais baixos, como por exemplo os dissacarídeos, sacarose, maltose, turanose e o trissacarídeo erlose, que são os que se apresentam em maior quantidade (Moreira & De Maria, 2001).

1.6.2 - Teor de água

Em geral, os méis devem ter no máximo 20% de teor em água. Situações de exceção são os méis de urze (*Calluna*) e mel para uso industrial em geral que poderá conter no máximo 23%, bem como o mel de urze (*Calluna*) para uso industrial, no máximo 25% (Decreto-Lei n.o 131/85, de 29 de Abril).

A percentagem de água no mel é muito importante, pois esta influência o tempo de vida útil do mel. Níveis baixos de atividade da água servem para o mel se manter estável, prevenir a granulação e evitar a fermentação durante o armazenamento (Olaitan *et al.*, 2007). O teor em humidade depende de vários fatores como, o grau de maturação na operculação das células dos quadrados da colmeia, da região de produção e das condições climáticas, e da época em que é efetuada a colheita (Finola *et al.*, 2007).

Os valores demasiado baixos de percentagem de humidade fazem com que a viscosidade do mel seja elevada e se torne em uma massa dura (Acquarone, 2004). O valor máximo de água presente no mel tem de ser respeitado por todos os apicultores, só assim os méis são aceites no comércio mundial (Estevinho et al., 2012)

1.6.3 — Teor de matérias insolúveis

O teor de matérias insolúveis no mel centrifugado e processado deve ser, no máximo, de 0,1g e 0,5g por 100g de mel respetivamente (Decreto-Lei n.o 131/85, de 29 de Abril).

As matérias insolúveis correspondem a componentes naturais resultantes do sedimento natural do mel, como os grãos de pólen, outras partículas presentes nos favos e as que resultam de contaminações durante o processamento do mel. Este depósito fornece indicação sobre as condições de processamento e de higienização praticadas durante o ato de recolha do mel (Vargas, 2006).

1.6.4 - Condutividade elétrica

Em geral o mel apresenta conductividade eléctrica, no máximo de 0,8 mS/cm, com excepções dos méis de flores de castanheiro e *Arbutus unedo* (medronheiro), *Erica* spp (erica), *Eucalyptus* spp (eucalipto), *Tilia* spp. (tília), *Calluna vulgaris* (torga ordinária), *Leptospermum* spp (leptospermo), *Melaleuca* spp. (melaleuca) e misturas desses méis, que podem apresentar níveis, no mínimo de 0,8 mS/cm (Decreto-Lei n.o 131/85, de 29 de Abril).

A condutividade elétrica está relacionada com a concentração de sais minerais, ácidos orgânicos e proteínas (Acquarone *et al.*, 2007), ou seja, difere perante a origem botânica utilizada pela abelha para obtenção de matéria-prima para os seus processos de alimentação e produção do mel. Assim sendo o teor de cinzas no mel é bastante diferente em cada amostra (Ojeda *et al.*, 2004). Méis monoflorais caracterizam-se por terem valores baixos de condutividade elétrica, embora méis com a mesma origem floral apresentem sempre valores similares, independentemente da época de colheita, origem geográfica e condições climáticas. No caso dos méis de melada apresentam valores elevados de condutividade elétrica (Zamora *et al.*, 2006).

1.6.5 — Ácidos livres

Os ácidos livres apresentam, em geral, concentrações totais máximas de 50 miliequivalentes de ácidos por 1000g de mel, para o uso industrial são permitidos valores máximos de 80 miliequivalentes de ácidos por 1000g (Decreto-Lei n.o 131/85, de 29 de Abril).

Os ácidos orgânicos são responsáveis pela acidez do mel e contribuem para o seu sabor, estando dependentes de vários fatores, como a origem floral (Küçük *et al.*, 2007) e a época de colheita (Finola *et al.*, 2007).

A acidez no mel está compreendida entre os valores de 3,5 e 4,5 na escala de pH (Bogdanov *et al.*, 2004).

Os ácidos encontrados na composição mel são os ácidos glucónico, fórmico, butírico, acético, málico, pirúvico, succínico, cítrico, maleico, láctico, oxálico, succínico, fumárico e tartárico (Suárez-Luque *et al.*, 2002b; Arruda, 2003).

O controlo de pH é um parâmetro utilizado para conservar produtos na indústria alimentar. O mel já possui valores baixos de pH que inibem o crescimento de microrganismos sendo, por isso, um parâmetro de qualidade importante durante que pode ser afetado por processos de extração e armazenamento que influenciam a sua textura e a vida de prateleira (Terrab *et al.*, 2004). Por exemplo, o ácido glucónico forma-se a partir do monossacarídeo D-glucose devido à ação da enzima D-glucose oxidase, o que resulta na libertação de uma molécula de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Moreira e De Maria, 2001). Após o armazenamento do mel, esta enzima mantém-se ativa (Mendes *et al.*, 2009), o que vai causar alterações no pH do mel de forma contínua, que por sua vez também vai influenciar a velocidade de formação do hidroximetilfurfural (HMF) (White J.W., 1978; Sodré *et al.*, 2007).

1.6.6 - Índice diastásico

O índice diastásico está relacionado com o tratamento térmico do mel. A diástase (α e β -amilase) é uma enzima que oferece alguma resistente ao calor, servindo de indicador de sobreaquecimento durante o armazenamento e o tempo de vida de prateleira. A atividade da enzima diástase diminui no mel com o envelhecimento e/ou aquecimento descontrolado, pois elevadas temperaturas provocam a desnaturação da enzima, destruindo-a (Vargas,

2006), Esta enzima hidrolisa a 40 °C numa hora 0,01 gramas de amido. Por isso, utiliza-se a sua sensibilidade ao calor para avaliar a frescura do mel (Küçük *et al.*, 2007). O índice diastásico deve ser determinado após tratamento e mistura do mel, em geral, com execuções do mel para fins industriais, o mel deve ter um índice diastásico (escala de Schade) de 8 valores (no mínimo). Em méis que são conhecidos por terem baixo teor natural de enzimas como a α e β -amilase, que podem ter valores mínimos de 3 valores.

O índice diastásico relaciona-se com o HMF ao nível da qualidade e frescura do mel. Para considerar um mel de elevada qualidade este deve ter uma atividade diastásica alta e um baixo teor de HMF.

1.6.7 - Teor de Hidroximetilfurfural

O hidroximetilfurfural (HMF) é um indicador de qualidade do mel que pode apresentar níveis HMF máximos de para uso industrial de 40mg/kg de mel, mas se o mel for de origem declarada de regiões de clima tropical e misturas desses méis, podem atingir valores máximos de HMF de 80mg/kg de mel. Pelo contrário o mel de citrinos deve ter níveis baixos de HMF (15 mg/kg de mel) alé de baixos níveis de índice diastásico (Decreto-Lei n.o 131/85, de 29 de Abril).

O seu composto congénere, 5-metilfurfural (5-MF) é formado pela desidratação de hexoses em meio ácido (Fig.1).

A partir dos hidratos de carbono pelas reações de Maillard, e por isso, revela informação sobre as condições às quais o produto esteve sujeito durante o armazenamento e o tempo de vida de prateleira, além de servir de indicador de adulterações provocadas por adição de açúcar invertido (Nozal *et al.*, 2001)

A formação de HMF depende também da composição química do mel, do seu pH (Fallico *et al.*, 2004), do tipo de açúcar relação entre frutose/sacarose (Vargas, 2006), da humidade presente (Gökmen *et al.*, 2008) e da concentração média de catiões divalentes (Gleiter *et al.*, 2006).

Em termos comerciais há vantagens em expor o mel a elevadas temperaturas para impedir a cristalização ou fermentação do mesmo e destruir microrganismos termolábeis. Em termos de qualidade do mel um processo é indesejável pois, leva à formação de HMF.

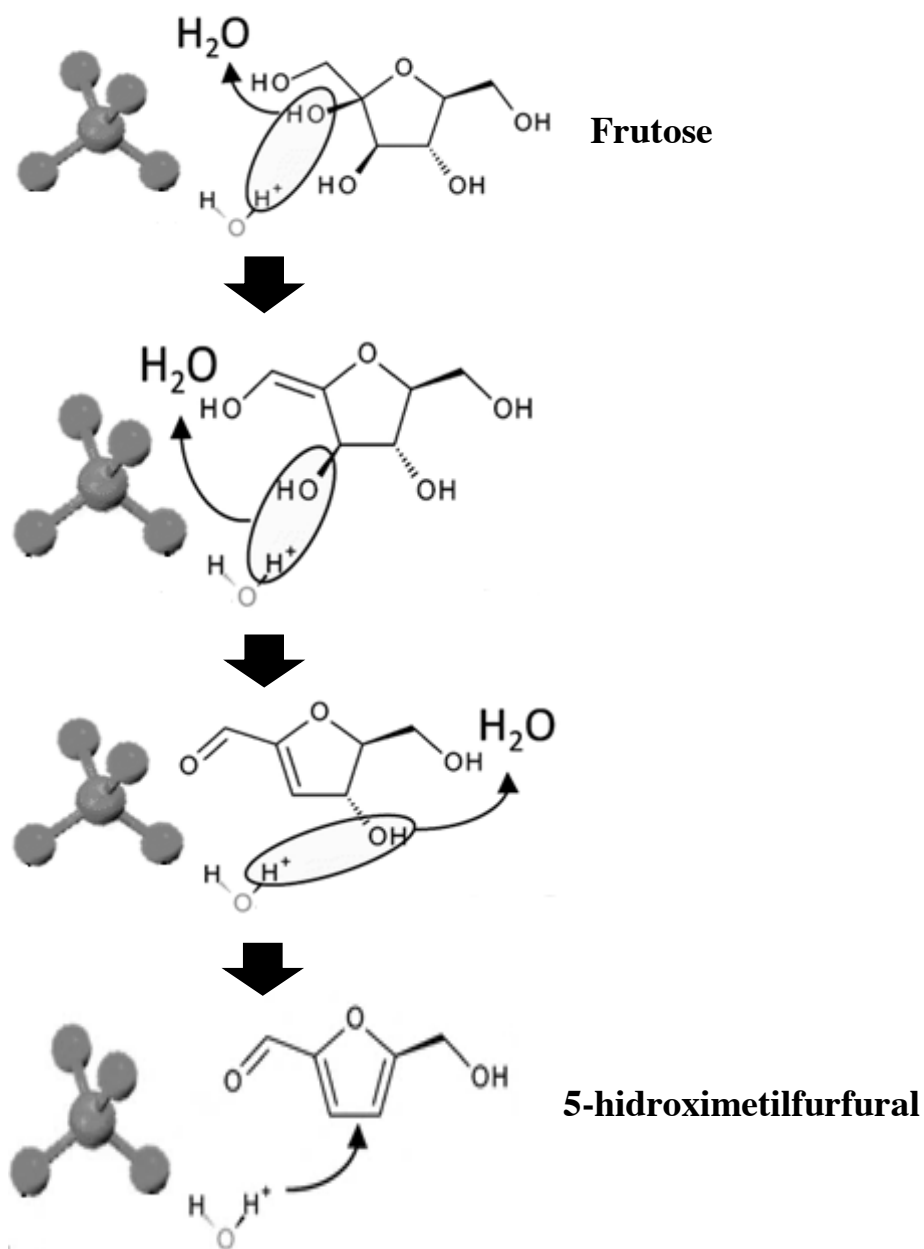


Fig.2 Formação de HMF e de 5-HMF a partir da frutose

Embora não se possa afirmar que a sua exposição em Humanos represente um risco potencial para a saúde (Capuano e Fogliano, 2011), a legislação obriga que na comercialização do mel não se ultrapasse os valores estipulados e referenciados em cima.

1.7 - Propriedades do mel

Resumidamente, o mel é uma solução saturada de açúcares, com água e componentes com um alto grau de complexidade adquirido a partir das características da origem floral do néctar usado na sua produção. É possível de encontrar diferentes propriedades biológicas no mel, tendo algumas que não são encontradas em nenhum outro composto produzido de forma natural ou artificial (Basualdo *et al.*, 2007; Beretta *et al.*, 2005).

1.7.1 - Cor

A cor do mel pode variar do branco-água a até quase negro, com variações de tonalidades verdes ou vermelha, ou até mesmo azul (Crane, E. 1980). A sua coloração depende da sua origem floral, de fatores climáticos, da temperatura a que o mel amadurece na colmeia e do armazenamento onde pode ocorrer o escurecimento devido a reações de Maillard (Arnaud *et al.*, 2008; Mantilla *et al.*, 2012).

No mercado Português, em geral, existe uma tendência da valorização dos méis mais claros em relação aos mais escuros. Os méis claros são os mais aceites pelo consumidor devido à relação entre o sabor e a cor, por serem mais suaves. Os méis mais escuros apresentam sabores mais fortes pelo facto de serem ricos em minerais, portanto mais adequado às necessidades dos organismos (Montenegro *et al.*, 2005), embora existam exceções onde alguns méis claros apresentam sabores fortes (Crane, E. 1980).



Fig.3 Escala de cores padrão do mel e valores mm PFund.

Existe um padrão comercial de classificação da cor do mel que é a escala de Pfund, elaborada pela Companhia Manufatura Koehler nos E.U.A (Tabela 1).

Tabela 1– Escala Pfund da cor do mel

Coloração	Escala de Pfund	Densidade ótica
Branco d'água	1 - 8 mm	Até 0,030
Extra branco	Mais de 8 - 17 mm	mais de 0,030 inclusive 0,060
Branco	Mais de 17 - 34 mm	mais de 0,060 inclusive 0,120
Extra âmbar claro	Mais de 34 - 50 mm	mais de 0,120 inclusive 0,188
Âmbar claro	Mais de 50 - 85 mm	mais de 0,188 inclusive 0,440
Âmbar	Mais de 85 - 114 mm	mais de 0,440 inclusive 0,945
Âmbar escuro	Mais de 114 mm	mais de 0,945

1.7.2 - Compostos Voláteis

Os compostos voláteis presentes no mel dependem da origem floral dos néctares usados na sua produção que atribuem características que definem o sabor e o aroma do mel estando dependentes da sua origem floral. O sabor global do mel é um critério decisivo para os consumidores (Finola *et al.*, 2007; Radovic *et al.*, 2001; Bonvehí e Coll, 2003).

Nos diferentes tipos de mel existentes, já foram encontrados cerca 300 compostos como ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, terpenos e ésteres (Castro-Vázquez *et al.*, 2009). Através do perfil de compostos voláteis presentes é possível obter informações através dos seus compostos voláteis sobre a origem botânica do mel e da forma com foi elaborado pelas abelhas, a partir do néctar de flores ou de exsudados secretados pelas plantas ou insetos (Escriche *et al.*, 2009).

A flora microbiana no mel pode fazer com que se formem mais compostos voláteis, através da sua atividade metabólica e desta forma apareçam aldeídos e álcoois ramificados, enquanto os derivados de furano formam-se pelas reações de Maillard ou desidratação de açúcares em meio ácido. A presença destes compostos no mel são indicadores da qualidade

microbiana, bem como do processo térmico e condições de armazenamento a que foi sujeito (Bastos *et al.*, 2002).

1.7.3 - Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis são metabolitos secundários derivados das plantas estes possuem a capacidade de eliminação de radicais livres (Bogdanov *et al.*, 2004; Ferreira, 2008) e, por isso, são objeto de estudo baseados na medição da atividade antioxidante *in vitro* que é de todo o interesse para o combate de determinadas doenças como o cancro (Yang *et al.*, 2001); doenças cardiovasculares (Perron e Brumaghim, 2009), osteoporose, doenças neuro-degenerativas e diabetes (Scalbert *et al.*, 2005) a estrutura destes compostos químicos caracteriza-se por possuir um anel aromático, contendo um ou mais grupos hidroxilo, ou seus derivados funcionais.

Conhecem-se cerca de 8.000 compostos fenólicos diferentes, que podem ser agrupados, de acordo com a sua estrutura química (Balasundram *et al.*, 2006) em nove classes: flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas, isoflavonóides, diidroflavanóis, chalconas, auronas.

O mel contém como constituintes secundários, os flavonoides e os ácidos fenólicos. Os principais flavonoides presentes no mel pertencem aos grupos das flavanonas e flavonas, por exemplo, a miricetina, tricetina, quercetina, hesperatina, luteolina, caempferol, pinocembrina, crisina, pinobanksina, genkvanina e galangina (Yao *et al.*, 2004; Baltrušaityt *et al.*, 2007; Bertoneclj *et al.*, 2007). Menos significativos, mas também presentes são os caempferide, quercetina 3',3'-dimetil éter, quercetina 7,3'-dimetil éter (Arráez-Román *et al.*, 2006), naringenina e apigenina (Estevinho *et al.*, 2008).

No caso dos ácidos fenólicos são possíveis de identificar no mel, os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico e p-cumárico, tendo como constituintes maioritários os ácidos cafeíco, ferrúlico, elágico e clorogénico, siríngico, vanílico e cinámico (Baltrušaityt *et al.*, 2007; Bertoneclj *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2008).

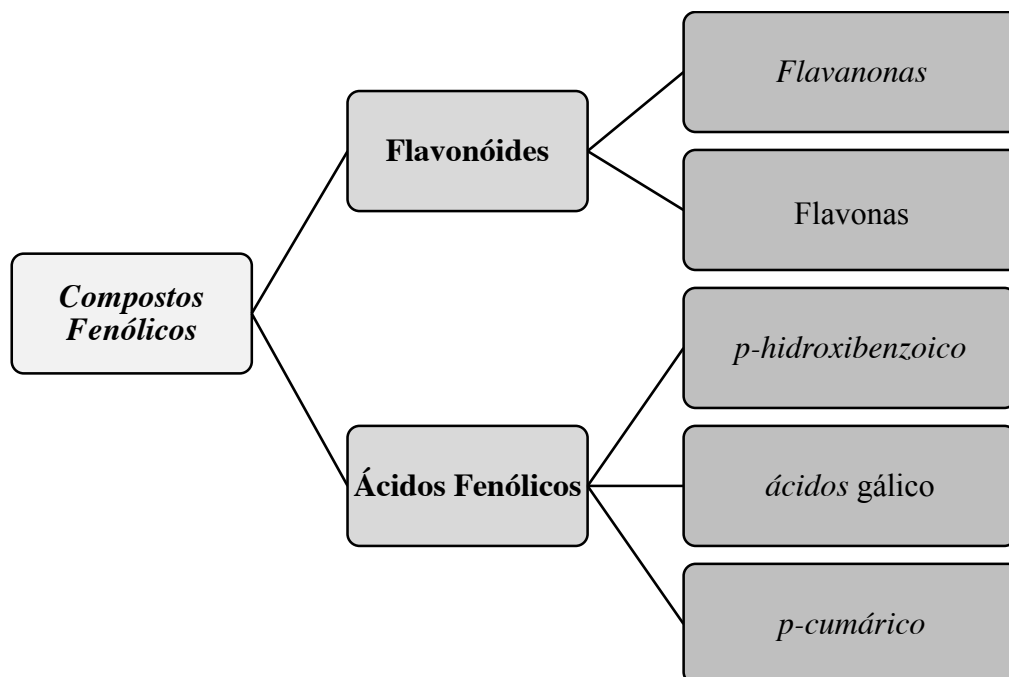


Fig.4 Esquema resumo dos compostos fenólicos mais abundantes no mel

1.7.4 – Microbiota

O mel pode ser considerado como um alimento microbiologicamente seguro (Vargas, 2006), embora possam existir sempre fontes de contaminação secundárias nos processos de produção, manuseamento, recolha e armazenamento do mel. Para evitar este tipo de contaminações devem-se implementar junto dos produtores apícolas normas de Boas Práticas de Fabrico (Finola *et al.*, 2007).

As características do mel e as suas propriedades, como por exemplo, os baixos valores de pH, humidade e atividade da água (a_w), bem como, os valores elevados de viscosidade, concentração de açúcares e pressão osmótica previnem a proliferação de microrganismos sobrevivência dos microrganismos (Iurlina e Fritz, 2005).

Neste âmbito, estudos mostraram que o mel tem ação natural sobre os bacilos responsável pela febre tifoide, que após exposição ao mel morreram em 40 horas, em quanto que as bactérias transmissoras de bronco pneumonia e infeções não resistiram por mais de 4 dias, após exposição ao mel. O mel atua também contra *Salmonellas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *Bacillus creus* e outras bactérias (Kujawski & Namiésnik, 2008).

Esta capacidade de ação contra bactérias faz com que este seja utilizado como curativo para ferimentos, queimaduras, infeções das vias respiratórias, gripes, resfriados, distúrbios cardíacos e intestinais, doenças de pele e vários outros casos.

Contudo existe uma espécie denominada por *Clostridium botulinum* que possui a capacidade de formar esporos que se instalam nos intestinos, onde produzem uma toxina de natureza proteica (proteína termolábil) que é capaz de causar o botulismo infantil que é uma neuromielose que pode levar a morte no homem.

Em crianças com menos de 12 meses, as instituições internacionais de controlo de doenças não recomendam que o mel seja utilizado na sua alimentação

A pasteurização é utilizada como forma de descontaminação do mel que sofre um processo térmico por aquecimento a 78°C durante 5 a 7 minutos seguido de um rápido arrefecimento. O choque térmico é capaz de matar bactérias. No entanto, este tratamento do mel trás desvantagens ao nível da qualidade do produto, como vimos anteriormente.

No entanto, o Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂) é o principal fator associado à atividade antimicrobiana da maioria dos méis, que é produzido enzimaticamente pelo glucose oxidase e secretado pelas abelhas (Molan, 2006; Weston, 2000; Aljadi & Yusoff, 2003; Olaitan *et al.*, 2007).

Nas secções seguintes faz-se uma apresentação da amostragem e análises efetuadas aos méis recolhidos, bem como, o tratamento estatístico efetuado no tratamento de dados analíticos. Os méis monoflorais a serem estudados neste trabalho são típicos de Portugal, como Castanheiro (*Castanea sativa*), Echium (*Echium vulgare*), Eucalipto (*Eucalyptus melliodora*), Laranjeira (*Citrus sinensis*), Rosmaninho (*Rosmarinus officinalis*) e Urze (*Ericaceae*), Alfarroba (*Ceratonia siliqua*), Medronheiro (*Arbutus unedo*), Poejo (*Mentha pulegium*) e Tomilho (*Thymus vulgaris*). Os 6 primeiros méis estão bem caracterizados ao nível das suas propriedades físico-químicas. Os 4 últimos são pela primeira vez estudados e comparados com os anteriores de forma a verificar e comparar as características apresentadas.

Capítulo II

Material e métodos



2.1 - Amostras de mel

As diferentes amostras de mel utilizadas neste estudo eram provenientes de mel monofloral, adquiridos em centros comerciais de zonas distintas de Portugal, como Albufeira, Almancil, Carvalhelhos, Mirandela, Montalegre, Redondo, Torres Vedras e Vinhais. Recolheram-se 25 amostras de mel, com o objetivo de obter a maior variabilidade possível entre as amostras de mel tendo-se, selecionado as amostras cujo rótulo tinha indicação de se tratarem de méis monoflorais.

No laboratório, os frascos de mel foram armazenados à temperatura ambiente num local escuro.

2.2 - Análises polínicas

A origem botânica das amostras foi determinada pela análise do espectro polínico com o objetivo de verificar a informação presente no rótulo. O método utilizado foi proposto por Louveaux *et al.* (1978).

Numa fase inicial pesaram-se 10 g de mel e dissolveram-se em 10 mL de H₂SO₄ a 5%. A solução foi colocada em banho-maria a 40°C para se dissolver completamente. Em seguida, para 2 tubos de Falcon, adicionou-se 10 mL da solução e acrescentou-se 5 mL de água, tendo-se posteriormente centrifugado durante 10 minutos a 2600 rpm. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, e lavou-se o precipitado com 10 mL de água destilada com agitação para remover completamente os açúcares do mel e dispersar novamente o sedimento. A solução passou para novos tubos de Falcon que foi novamente centrifugado com o objetivo de remover o sobrenadante.

Por fim, prepararam-se as lâminas com uma gota de sedimento e uma gota de glicerogelatina, fixada à chama e solidificada antes da observação. Para identificar e quantificar todos os tipos de pólen utilizou-se um microscópio ótico a 400× e 1000×. O reconhecimento dos diferentes tipos de pólen foi possível através da coleção de referência da Escola Superior Agrária de Bragança.

2.3 – pH

O pH do mel foi determinado pelo método descrito por Bogdanov *et al.*, (1997). Dissolveram-se 10 g de mel num goblé em 75 mL de água destilada. Esta solução foi colocada em banho a 20°C até atingir o equilíbrio, a medição do pH foi efetuada com o medidor de pH Meter Basic 20 (2002) calibrado diariamente com 2 soluções tampão comerciais de pH 4,00 e 7,00.

2.4 – Acidez

A acidez do mel foi determinada conforme o método apresentado por Bogdanov *et al.*, (1997). Dissolveram-se 10 g de mel num goblé em 75 mL de água destilada, em seguida foram adicionadas 4 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína. A solução foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N que é incolor em meio ácido e muda de cor para rosa em meio basico, para confirmar a alteração espera-se durante 10 segundos.

O valor da acidez foi expresso em miliequivalentes de ácido por quilograma de mel e determinado utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Acidez} = 10 * V \text{ (mL de NaOH)}$$

Sendo, V, o volume de solução de NaOH gasto na titulação

2.5 - Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica do mel foi determinada com base no método descrito por Sancho *et al.*, (1991). Dissolveram-se 10 g de mel num goblé em 75 mL de água destilada e a solução foi colocada num banho a 20°C que após ter atingido o equilíbrio, foi lida a condutividade (Condutivimetro Inolab, 1999).

Os valores da condutividade foram multiplicados por 1,5 e os resultados apresentaram-se em 10^{-3} S/cm.

2.6 – Teor de Cinzas

O conteúdo de cinzas do mel foi determinado por condutivimetria, conforme a metodologia proposta por Sancho *et al.*, (1991). A partir dos valores obtidos para a condutividade em 10^{-4} S/cm calculou-se a % de cinzas totais de acordo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ cinzas totais} = ((0,083 * \text{condutividade}) - 0,092)$$

$$\% \text{ cinzas solúveis} = ((0,070 \times \text{condutividade}) - 0,102)$$

$$\% \text{ cinzas insolúveis} = ((0,0126 \times \text{condutividade}) + 0,0092)$$

2.7 – Humidade

A água contida na amostra de mel foi determinada com base no método refratométrico descrito por Anónimo (1986). A amostra de mel foi homogeneizada e lida com um refratômetro. Os resultados expressaram-se em % (p/p).

2.8 – Cor

A cor do mel foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico, apresentado no trabalho de Montenegro *et al.*, (2005). Pesaram-se 5 g de mel num tubo de falcon de 50 mL e adicionaram-se em 10 mL de água desionizada. A solução obtida preparada foi colocada numa cuvete de plástico e após repouso durante 10 a 15 minutos, antes efetuou-se a leitura da absorvância a 650 nm (espectrofotómetro UV-visível (Varian Cary Scan model,1998), utilizando como branco a água destilada.

A cor do mel foi definida na escala de mm Pfund, a partir do valor da absorvância através da seguinte expressão:

$$\text{Mm Pfund} = -38,70 + 371,39 \times \text{Absorvância}$$

Depois de calculados os mm Pfund utilizou-se a Tabela 2 para fazer a correspondência com a cor do mel.

2.9 - Açúcares Redutores

A presença de glucose e frutose no mel foram determinadas conforme o método descrito por Bogdanov *et al.*, (1997). Dissolveram-se 1 g de mel em 25 mL de água destilada e, após a dissolução, o volume foi ajustado a 100 mL num balão volumétrico com água destilada (solução de mel). Usando 25 mL desta solução de mel num balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada (solução diluída de mel). Num copo graduado de 250 mL, adicionaram - se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, 7 mL de água destilada e 14 mL da solução diluída de mel para um copo graduado de 250 mL. A solução contida no copo foi aquecida até à ebulição e ferveu durante 2 minutos, após os quais se adicionou 1 mL de azul-de-metileno 0,2% (p/v). Esta solução foi titulada com a solução diluída de mel até haver mudança de cor. O volume da solução diluída de mel gasto na titulação foi subtraído a 25 mL, correspondendo o valor obtido ao volume de água usado na dosagem. Para a dosagem, num copo graduado de 250 mL adicionaram-se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, o volume de água destilada determinado previamente e 12,5 mL de solução diluída de mel contida na bureta. A solução foi aquecida e ferveu durante 2 minutos, após os quais se adicionou 1 mL de azul-de-metileno 0,2% (p/v). Esta solução foi titulada com a solução diluída de mel da bureta até haver mudança de cor.

O teor em açúcares redutores foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$C = \frac{2000}{P \times V}$$

Onde P é o peso da amostra de mel e V é o volume da solução diluída de mel gasto na segunda titulação.

2.10 – HMF

O HMF foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Anónimo (1986). Pesaram-se rigorosamente 5 g de mel que, depois da diluição em 25 mL de água destilada, foram colocadas num balão volumétrico de 50 mL ao qual foram adicionados 0,5mL de solução Carrez I e 0,5 mL de solução Carrez II. Após a mistura, o balão foi aferido com água destilada. Em seguida, filtrou-se com papel de filtro a solução desprezando-se os primeiros 10 mL de filtrado, recolheram-se alíquotas de 5 mL para dois

tubos de ensaio. A um dos tubos adicionaram-se 5 mL de água destilada (amostra) e ao outro tubo, 5 mL de solução bissulfito sódio 0,2% (p/v) (referência). Agitou-se vigorosamente e leu-se a absorvância das soluções a 284 e 336 nm utilizando-se cuvete de quartzo de 1cm (espectrofotômetro UV-visível Varian Cary 50 Scan model, 1998).

Nas absorvâncias superiores a 0,6 é necessário fazer uma nova diluição de soluções, para nova leitura de absorvâncias, a solução da amostra foi diluída com água e a solução de referência com bissulfito sódio a 0,1% (p/v).

O valor de HMF foi determinado através da seguinte fórmula:

$$\text{mg HMF/100g de mel} = (\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336}) \times 14,97 \times (5/\text{g de amostra})$$

Para efeitos comparativos com os valores obtidos pelo processo experimental anteriormente explicado, foi também usado o aparelho Reflectoquant® com tiras específicas para leitura de HMF em mel, que permitem um intervalo dinâmico de análise de 1.0 - 60.0 mg/l de HMF.

2.11 - Índice diastásico

O Índice Diastásico foi determinado de acordo com o método descrito por Anônimo (1986). Pesaram-se com precisão 10 g de mel num copo graduado de 50 mL e adicionou-se 5 mL de tampão acetato pH 5,3 e 20 mL de água destilada para dissolver a amostra. Num balão volumétrico de 50 mL colocaram-se 3 mL de cloreto de sódio 0,5M e adicionou-se a solução de mel, perfazendo-se o volume com água destilada. Transferiram-se 10 mL desta solução para dois balões volumétricos de 50 mL que foram colocados em banho-maria a 40°C, conjuntamente com o balão que contém a solução de amido com um índice de azul entre 0,5 e 0,55. Após 15 minutos no banho, adicionaram-se 5 mL da solução de amido à solução de mel contida num dos balões (solução amostra) e 5 mL de água destilada para o outro balão (solução referência). No momento misturou-se, com uma rápida agitação e começou-se a contar o tempo de reação. Em intervalos de tempo de 5 minutos, transferiram-se 1 mL dos balões de referência e amostra para balões volumétricos de 50 mL que continham 10 mL de solução de iodo 0,0007N e 35 mL de água destilada. Leu-se a absorvância da solução amostra a 660 nm no espectrofotômetro UV-visível (Varian Cary Scan model, (1998), utilizando como branco a solução referência.

A absorvância da amostra foi lida de 5 em 5 minutos até atingir um valor inferior a 0,235. Para determinar tempo em que a absorvância atingiu esse valor, construiu-se um gráfico de absorvância em função do tempo. A reta foi desenhada com pelo menos os três últimos pontos do gráfico, de modo a determinar por interpolação o tempo em que a absorvância atingiu o valor de 0,235. O índice diastásico (ID) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$ID = 300/ t$$

Em que, t = tempo (minutos). Os resultados foram expressos em graus Gothe.

2.12 – Teor em fenóis

Para determinar os compostos fenólicos totais utilizou-se o método Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Cinco g de mel foram diluídos em 50 mL de água destilada e filtrados. Esta solução (0,5 mL) misturou-se com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 0,2 N. Após 5 min, adicionou-se 2 mL de 75 g/L de carbonato de sódio (Na₂CO₃). Após a incubação à temperatura ambiente por 2 h, mediu-se a absorvância da mistura a 760 nm contra um branco (metanol). Utilizou-se o ácido gálico (0-200 mg / L) como padrão. O total de compostos fenólicos foi expresso em mg de ácido gálico equivalentes (GAME) / 100 g de mel (citado por Meda *et al.*, 2005). Foram efetuadas 3 repetições para cada ensaio.

2.13 – Teor em flavonóides

Num tubo de ensaio colocaram-se 250 µL de mel, 75 µL NaNO₂ a 5% e 1,25 mL de água destilada. Após 5 minutos, adicionou-se 150 µL de AlCl₃H₂O a 10%. Ao fim de 6 minutos juntou-se 500 µL de NaOH 1M e 275 µL de água destilada. Agitou-se vigorosamente e leram-se as absorvâncias no espectrofotómetro a 510 nm. A curva de calibração foi feita com o reagente catequina (2,5-40 mg/L). Os ensaios foram realizados em triplicado. O método usado para a determinação de flavonóides foi o método de Zhishen *et al.*, (1999) (citado por Liu *et al.*, 2009). Esta análise foi efetuada em triplicado.

2.14 – Análises Microbiológicas

A análise microbiológica foi efetuada a todas as amostras de mel com o objetivo de avaliar a qualidade comercial (mesófilos e bolores e leveduras), qualidade sanitária (Coliformes totais e fecais e *S. aureus*) e segurança (esporos de Clostrídeos sulfito-redutores) do produto.

2.14.1. Preparação da amostra

A preparação da amostra foi realizada de acordo com a NP-1829 (1982). Para tal, foram pesadas numa balança (Mettler PC Model 2000), em condições de assepsia, 10 g de amostra e homogeneizadas com 90 mL de água peptonada (diluição 10^{-1}). Após homogeneização da amostra, procedeu-se à preparação das diluições decimais (10^{-2} e 10^{-3}), transferindo asepticamente 1 mL da amostra para um tubo de ensaio contendo 9 mL de diluente (água peptonada). Com uma nova pipeta, homogeneizou-se esta suspensão e transferiu-se 1 mL desta diluição para novo tubo de ensaio contendo 9 mL de Água peptonada.

Após a preparação das amostras e das respetivas diluições, procedeu-se à inoculação em meios de cultura apropriados para cada microrganismo pesquisado.

Os microrganismos estudados nas amostras de mel foram: aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, *Escherichia coli*, esporos de clostrídios sulfito redutores e *Salmonella sp.*

2.14.2. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos

Para a contagem de microrganismos aeróbios totais procedeu-se à sementeira por incorporação. Transferiu-se 1 mL das diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) para placas de Petri esterilizadas e identificadas. Terminada a distribuição do inóculo pelas placas de Petri, verteu-se para cada uma das placas cerca de 15 mL de meio de cultura PCA (Plate Count Agar). Plaqueou-se uma placa estéril, sem inóculo, que serviu como controlo. Após a solidificação do meio de cultura, incubaram-se as placas em posição invertida na estufa a 30°C durante 72 h. Por fim, procedeu-se à contagem das colónias presentes em cada placa de acordo com a ISO 4833/2003. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por gramas de produto analisado (UFC/g), segundo a fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{\Sigma c}{V \times (n1 + 0,1 \times n2) \times d}$$

Onde:

Σ – soma das colónias em todas as placas contadas (entre 15 e 150 colónias);

d – diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens;

n1 – número de placas da 1ª diluição contada;

n2 – número de placas da 2ª diluição contada;

V – volume de inóculo semeado em cada placa.

2.14.3. Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA), com adição de ácido tartárico a 10%. A sementeira foi feita por espalhamento à superfície de 0,1 mL de cada diluição decimal. As placas foram incubadas na estufa a 20-25°C durante 5 dias. Após o período de incubação procedeu-se à contagem das colónias e os resultados foram expressos em UFC/g de acordo com a fórmula anteriormente referida para a contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos.

2.14.4. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

A contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada utilizando o Kit sistema simplate da Bio Control (método oficial AOAC 2005.03) e procedeu-se de acordo com as recomendações do fabricante. O meio de cultura fornecido foi hidratado em 100 mL de água estéril. Em tubos de ensaio foram colocados 9 mL de meio de cultura previamente hidratado com 1 mL da amostra e homogeneizou-se com auxílio do vórtex. Em seguida, verteu-se o conteúdo dos tubos para a placa contendo 84 poços e espalhou-se uniforme e cuidadosamente o líquido com movimentos circulares para que os poços ficassem totalmente cobertos e sem bolhas de ar. Por último, o excesso foi removido. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 a 48 h. Após o período de incubação, procedeu-se à enumeração dos coliformes totais através da contagem do número de poços em que ocorreu mudança de cor do meio de cultura. Enquanto, para a identificação e enumeração da *Escherichia coli* procedeu-se à contagem do número de poços em que se observou fluorescência aquando da exposição da placa a uma lâmpada de UV a 365nm.

Através de uma tabela fornecida pelo fabricante, calculou-se o número de coliformes presentes na amostra e os resultados foram expressos em UFC/g.

2.14.5. Pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores

Nos esporos de clostrídeos foi realizada de acordo com a NP-2262:1986. Em tubos de ensaio estéreis colocaram-se 5 mL e 10 mL de amostra. Os tubos foram colocados em banho-maria a 80°C, durante 10 minutos para inativar a amostra. Após inativação foram transferidos para placas de Petri. Em seguida, preparou-se o meio TSA-Agar (Tryptose Sulfito Agar) e adicionou-se às amostras anteriores (sementeira por incorporação). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 48 h. Consideram-se positivas as placas em que apareceu um precipitado negro à volta das colónias.

2.14.6. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para os *Staphylococcus aureus* foi efetuada de acordo com a NP 4400-1:2002, por espalhamento à superfície de 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo o meio seletivo de Baird-Parker enriquecido com gema de ovo. Incubaram-se as placas invertidas a 37°C ± 1°C durante 48 h ± 4 h. Após o período de incubação, apenas foram consideradas como colónias características as negras ou cinzentas, brilhantes e convexas (1,5 a 2,5 mm de diâmetro após 48 h) rodeadas de um halo transparente. Como não características foram consideradas as colónias negras e brilhantes ou cinzentas, com ou sem bordo branco estreito e em que a zona transparente está ausente ou é pouco visível. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g).

2.14.7. Isolamento e identificação de bolores e leveduras

Algumas colónias isoladas foram selecionadas e repicadas para placas contendo meio de leveduras sólido, para obtenção de culturas puras, após contagem das leveduras nas placas com meio PDA com adição de ácido tartárico a 10% e incubadas durante 2 dias a 25°C. Após o período de incubação, observou-se as características dos isolados, de modo a verificar se eram leveduras e se estas eram culturas puras. Os isolados foram identificados através de galerias API 20C AUX (BioMérieux, França) (Fig. 8) e utilizado de acordo com as

instruções do fabricante. Inicialmente procedeu-se à preparação da caixa de incubação, devidamente identificada na lingueta lateral, distribuindo 5 mL de água destilada nos alvéolos para criar uma atmosfera húmida. Após retirar a galeria da embalagem individual, colocou-se na caixa de incubação. Seguidamente, utilizou-se uma fração de colónia isolada para obter uma suspensão de opacidade equivalente a 2 McFarland num tubo de ensaio contendo 2 mL de NaCl 0,85%. Em seguida, 100 µl da suspensão foi transferida para ampola de API C Medium, proveniente no Kit. A suspensão obtida em API C Medium foi homogeneizada cuidadosamente, para evitar a formação de bolhas, e inserida nas cúpulas da galeria do Kit, a qual contém substratos desidratados, e incubada a 30°C ±2°C durante 48-72 h. Posteriormente, realizou-se a primeira leitura do teste. A cúpula que apresentou maior turbidez que o controlo (meio API 20 C sem substrato), foi considerada reação positiva a anotar na ficha de resultados. A galeria foi novamente incubada até completar o período de 72 h conforme a orientação do fabricante. Após as 72 h, realizou-se uma segunda leitura confirmatória. A identificação da levedura foi obtida a partir de um perfil numérico. A cada resultado positivo foram atribuídos os dígitos 1,2 ou 4. A combinação destes dígitos, agrupados por sete grupos, forneceu um código numérico, que permitiu através do programa de identificação apiweb TM fornecido pela empresa identificar a espécie de levedura.

2.14.8. Contagem de *Salmonella sp.*

A deteção de *Salmonella sp.* foi realizada utilizando a técnica de imunodifusion test 1-2, teste de utilização única para *Salmonella* (AOAC, 2005). Foram realizadas as leituras após 16-20 h da adição da amostra pré-enriquecida com água peptonada tamponada e adição de anticorpo específico. Os resultados são interpretados visualmente observando o desenvolvimento de uma imunobanda.

2.15 – Métodos estatísticos

Todas as experiências foram realizadas de forma aleatória e sempre com 3 réplicas. Na análise estatística dos dados analíticos obtidos, numa primeira abordagem, foi realizada uma análise descritiva geral, calculando médias, desvios padrão e percentagens relativas de desvio padrão. Como as amostras eram diferentes entre si e para estudar as diferenças entre os resultados obtidos, aplicou-se a Anova de 1 fator, considerando que os dados

apresentavam normalidade e homogeneidade de variâncias (os erros de cada parâmetro físico-químico medido nas várias amostras de mel foram baixos e da mesma ordem de grandeza).

No estudo multidimensional usou-se a análise de agrupamentos estatísticos (MDS, “multidimensional scaling”) que permite visualizar o padrão de proximidades (isto é, semelhanças ou distâncias) entre um conjunto de amostras. Corresponde a uma ordenação, utilizada na visualização de informação, onde a informação sobre as distâncias (distância Euclideana) entre as amostras (contida numa matriz de distância e corresponde às similaridades entre pares de amostras) é apresentada num novo espaço N-dimensional. O gráfico é analisado ao nível das semelhanças entre amostras, verificando-se que quanto menor a proximidade (maior a semelhança), menor a distância entre pontos e vice-versa. Se os dados de entrada fossem semelhanças, a relação teria sido negativa: quanto menor a similaridade de entrada entre os itens, mais distantes seriam na imagem. Esta técnica utiliza um algoritmo de minimização de funções que avalia diferentes configurações com o objetivo de maximizar a qualidade do ajuste (ou minimizar a "falta de ajuste"). Se $N=2$, então, a informação é representada num gráfico bidimensional (Borg *et al.*, 2005). O MDS permite analisar qualquer tipo de matriz de distância ou similaridade e é considerada uma alternativa à análise fatorial, que requer que os dados multivariados mostrem distribuição normal, e que as relações sejam lineares. Pelo contrário, MDS não tem estas restrições, estando apenas dependente da significância do ordenamento das distâncias (ou similaridades). A análise fatorial também tende a extrair mais fatores (dimensões) e, por isso, MDS permite uma interpretação mais fácil dos resultados. Outra vantagem do MDS é que pode ser aplicado diretamente a qualquer tipo de distâncias (ou semelhanças) e, por isso, tem uma grande potencialidade de aplicação, enquanto que, a análise fatorial precisa de calcular uma matriz de correlação.

Todos os estudos estatísticos foram realizados utilizando-se o programa estatístico R (versão 2.15.1) [46 R Project] e adotando-se 5% ($p < 0,05$) de nível de significância

Capítulo III

Resultados e discussão



Os resultados analíticos a seguir apresentados resultam das análises polínicas, físico-químicas e microbiológicas realizadas às 25 amostras de mel, efetuadas em triplicado. A análise polínica permitiu estabelecer o perfil polínico de cada amostra com o objetivo de as classificar em mel monofloral ou multifloral, bem como, verificar a influência dos dois pólenes mais predominantes nas características físico-químicas. Nas análises físico-químicas ao mel avaliou-se a cor, o pH, a acidez total, a humidade, a condutividade elétrica, o teor em cinzas, o HMF, a diástase, o teor em sacarose, os teores em fenóis e os flavonoides. Nas análises microbiológicas foram quantificados/pesquisados os seguintes microrganismos: aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus*, Coliformes totais, *Escherichia coli*, esporos de *Clostridios* sulfito redutores, *Salmonella sp* e *Bacillus cereus*.

3.1 - Amostragem

As amostras de mel foram adquiridas comercialmente diretamente a produtores de mel de várias regiões de Portugal com o objetivo de obter méis monoflorais. Na Tabela 2 apresenta-se a informação presente nos rótulos dos méis adquiridos sobre a origem floral, bem como, a identificação usada para cada mel nas análises.

Tab.2: Identificação das amostras de mel de acordo com a origem floral presente no rótulo

Amostras	Identificação	Informação no rótulo	Amostras	Identificação	Informação no rótulo
1	Cas2	Castanheiro	14	Euc1	Eucalipto
2	Poe1	Poejo	15	Tom1	Tomilho
3	Med1	Medronheiro	16	Tom2	Tomilho
4	Eri2	Urze	17	Poe4	Poejo
5	Med2	Medronheiro	18	Poe2	Poejo
6	Euc3	Eucalipto	19	Ros2	Rosmaninho
7	Med3	Medronheiro	20	Euc2	Eucalipto
8	Alf2	Alfarroba	21	Lar1	Laranja
9	Eri1	Urze	22	Lar2	Laranja
10	Alf1	Alfarroba	23	Ros1	Rosmaninho
11	Cas1	Castanheiro	24	Ech2	Echium
12	Alf3	Alfarroba	25	Ech1	Echium
13	Poe2	Poejo			

Os méis foram analisados no seu perfil polínico para confirmar a classificação do tipo de mel presente no rótulo.

3.2 - Análises Polínicas

A origem floral e geográfica constitui aspetos importantes para a qualidade do mel pois, influenciam significativamente o seu valor comercial (Estevinho *et al.*, 2012). A análise polínica permite conhecer a fonte floral de cada amostra de mel e por isso, importante para confirmar se esta é mel polifloral ou monofloral e quais os dois pólenes mais predominantes. Para a classificação em mel multifloral e monofloral usou-se critério geral (Arruda, 2003) baseado no pólen de maior predominância: méis com percentagem superiores a 45% de um pólen são monoflorais. Com exceções de méis de *Lavandula* e *Castanea* que são classificados em méis monoflorais se o respetivo pólen tem níveis superiores a 15 e 90%, respetivamente.

Os resultados globais obtidos nas análises polínicas estão sumariados na Tabela 3 que mostra todos os tipos de pólen identificadas no mel, bem como, a percentagem de méis onde o pólen foi identificado e quantificado. Apresenta-se também as siglas para representar as espécies botânicas do pólen, que vão ser usadas no texto, tabelas e gráficos. Os resultados apresentados mostram que neste trabalho, as 25 amostras de mel têm um perfil polínico variado, tendo-se identificado 21 pólenes. A Figura 5 mostra um gráfico de barras que traduz os valores de percentagens de méis com o pólen identificado. Esta figura permite visualizar que os 6 pólenes mais presentes nos méis são, por ordem decrescente de predominância, os de *Echium sp.* (96%), *Rubus sp.* (80%), *Leontodon sp.* (76%), *Lavandula sp.* (68%) e, com percentagem igual, o *Eucalyptus sp.* e *Prunus sp.* (64%).

Com níveis de predominâncias baixas (8%, pólen presente em só 2 amostras) foram detetados os pólenes de *Pinus sp.*, *Foeniculum sp.* e *Thymus vulgaris sp.*. Os restantes pólenes mostram estar presentes em 12 a 52% das amostras de mel analisadas.

Na Tabela 4 mostra-se o perfil polínico obtido para cada amostra de mel analisado, apresentando-se os valores médios percentuais (duas análises por cada amostra se o desvio médio for inferior a 5%) associados à contagem de pólenes. Como já foi referido, a classificação em mel mono ou multifloral foi efetuada usando o valor de percentagem do pólen predominante no perfil polínico. A informação dos dois pólenes predominantes mostra que não há dois méis iguais, mesmo sendo classificados como mel monofloral da mesma origem floral.

Tab.3 Identificação de espécies botânicas

perante as siglas

Siglas	Pólen presentes nas amostras	% de pólen nas amostras
ACA	<i>Acacia sp.</i>	12
ARB	<i>Arbustus unedo sp.</i>	20
CAR	<i>Cardus sp.</i>	16
CER	<i>Ceratonia siliqua sp.</i>	12
CIT	<i>Cytisus sp.</i>	28
CIT	<i>Citrus sp.</i>	16
ECH	<i>Echium sp.</i>	96
ERI	<i>Erica sp.</i>	44
EUC	<i>Eucalyptus sp.</i>	64
LAV	<i>Lavandula sp.</i>	68
CAS	<i>Castanea sp.</i>	52
PIN	<i>Pinus sp.</i>	8
PRU	<i>Prunus sp.</i>	64
TRI	<i>ium sp.</i>	36
RUB	<i>Rubus sp.</i>	80
FOE	<i>Foeniculum sp.</i>	8
LEO	<i>Leontodon sp.</i>	76
UMB	<i>Unbelifera sp.</i>	20
TRI	<i>Thymus vulgaris sp.</i>	8
MIN	<i>Mimosaceae sp.</i>	12
MEN	<i>Mentha pulegium sp.</i>	16

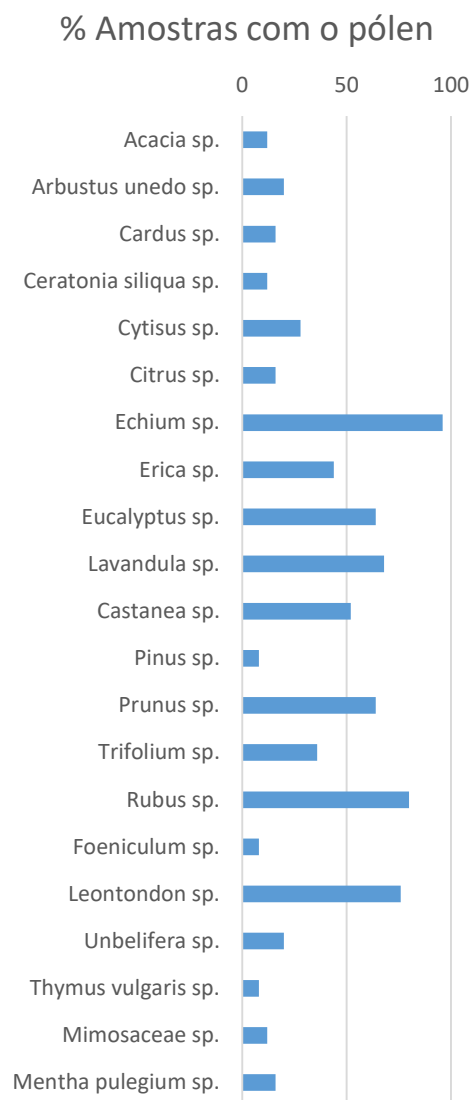


Fig.5 Ilustração gráfica da % de pólen

Tab. 4: Perfil polínico de cada amostra de mel, analisados.

		Amostras de Mel																								
Informação no rótulo	Eri1	Eri2	Ech1	Ech2	Cas1	Cas2	Poe1	Poe2	Poe3	Poe4	Lar1	Lar2	Ros1	Ros2	Tom1	Tom2	Euc1	Euc2	Euc3	Med1	Med2	Med3	Alf1	Alf2	Alf3	
<i>Acacia sp.</i>										9,45														3,0	3,3	
<i>Arbustus unedo</i>																				50,4	48,0	53,2		8,5	19,1	
<i>Cardus sp.</i>	7,1														7,5										15,8	
<i>Castanea sativa</i>	16,3	32,8	8,5	7,6	71,7	77,7	16,0	10,4	16,0				5,0	6,3			8,9			7,3			4,1			
<i>Ceratonia siliqua</i>																							47,4	53,7	50,3	
<i>Citrus sp.</i>		9,0									48,0	57,5			6,4										4,8	
<i>Cytisus sp.</i>	6,0					2,6									11,4				4,4		7,7	7,7				
<i>Echium sp.</i>	5,0		46,6	57,8	6,1	2,4	14,7	15,1	14,7	23,8	23,2	16,2	43,3	20,5		9,9	9,7	2,7	4,1	10,6	9,2	16,8	16,2	5,5	6,2	
<i>Erica sp.</i>	48,4	34,7	2,4	1,9	6,0												10,3	3,9	2,9	4,7			2,4			
<i>Eucaliptus sp.</i>	4,9	1,5	3,0			3,2	3,8	6,3	3,8	3,0	7,0				5,2	5,0	67,0	79,5	73,3	2,6		3,9		7,2		
<i>Foeniculum vulgare</i>																		9,2								
<i>Lavandula sp.</i>			7,8	11,5		2,5	8,4	9,4	8,4		7,3		31,7	49,4	9,5	5,8				10,0	9,3	9,2	3,2	3,9		
<i>Leontodon sp.</i>	6,6		2,4	1,9		2,0	1,6	2,2	1,6	2,7	6,8			7,7	10,2	5,8		1,8	5,5	4,6	8,1	4,6	10,3		3,0	
<i>Mentha pulegium</i>							42,4	51,0	42,6	56,0																
<i>Mimosaceae</i>															3,9		4,2						3,4			
<i>Pinus sp.</i>																								10,4	2,5	
<i>Prunus sp.</i>	5,9	7,9	5,5	7,7	4,6	3,9					3,9		6,7	6,5	3,3	8,9		3,0	2,9		9,4		4,9	5,0		
<i>Rubus</i>		7,4	1,8	7,2	6,2	2,9	6,4	5,7	6,4	5,2	4,0	8,7	13,3	4,3	6,5	3,3			7,1	4,0	8,4		3,0			
<i>Thymus vulgaris</i>															43,8	46,2										
<i>Tryfolium sp.</i>		6,7	17,4		5,6	2,9	2,8		2,7			17,6				7,9				5,9			4,5			
<i>Umbelifera</i>			4,7	4,4			3,8		3,8					5,3									3,0			

Origem Botânica Pólen

Devido a esta variação, na Tabela 5 mostra-se a classificação atribuída (mel mono e multifloral), bem como, a nova identificação atribuída a cada amostra que corresponde às siglas identificativas das espécies botânicas dos dois pólenes predominantes com as respetivas percentagens. É um fato que os tipos e quantidades de pólenes presentes no mel são um fator fundamental para o estudo e compreensão da variação que existe entre as amostras. A tabela mostra que só 4 amostras adquiridas foram classificadas como méis multiflorais, estando as restantes de acordo com a informação presente no rótulo.

Tab.5: Classificação do tipo floral do mel segundo a análise polínica e identificação das amostras baseada nos pólenes das duas espécies predominantes

Amostras	Informação no rótulo	Identificação usando 2 Pólenes mais predominantes *1	Classificação floral do mel *2
1	Castanheiro	CAS78_PRU4	M
2	Poejo	POE42_CAS16	<i>Mentha pulegium</i>
3	Medronheiro	ARB50_LAV10	<i>Arbustus unedo</i>
4	Urze	ERI35_CAS33	M
5	Medronheiro	ARB48_PRU9	<i>Arbustus unedo</i>
6	Eucalipto	EUC73_RUB7	<i>Eucaliptus sp</i>
7	Medronheiro	ARB53_ECH17	<i>Arbustus unedo</i>
8	Alfarroba	CER54_PIN10	M
9	Urze	ERI48_CAS16	<i>Erica sp.</i>
10	Alfarroba	CER47_ECH14	<i>Ceratonia siliqua</i>
11	Castanheiro	CAS72_RUB6	M
12	Alfarroba	CER50_ARB19	<i>Ceratonia siliqua</i>
13	Poejo	POE51_ECH15	<i>Mentha pulegium</i>
14	Eucalipto	EUC67_ERI10	<i>Eucaliptus sp</i>
15	Tomilho	TRI44_CIT11	<i>Thymus vulgaris</i>
16	Tomilho	TRI46_ECH10	<i>Thymus vulgaris</i>
17	Poejo	POE56_ECH24	<i>Mentha pulegium</i>
18	Poejo	POE50_EUC12	<i>Mentha pulegium</i>
19	Rosmaninho	LAV49_ECH20	<i>Lavandula sp.</i>
20	Eucalipto	EUC80_FOE9	<i>Eucaliptus sp.</i>
21	Laranja	CIT48_LAV7	<i>Citrus sp.</i>
22	Laranja	CIT58_TRI18	<i>Citrus sp.</i>
23	Rosmaninho	LAV32_ECH43	<i>Lavandula sp</i>
24	Echium	ECH61_LAV10	<i>Echium sp.</i>
25	Echium	ECH47_TRI17	<i>Echium sp.</i>

*1) Abreviaturas de espécie e percentagem de pólen. Por exemplo CAS78_PRU4 – *Castanea sativa* 78% *Prunus sp.* 4% (abreviaturas de finidas na Tabela 3). *2) M - multifloral

Na secção seguinte apresentam-se os resultados obtidos das análises físico-químicas às amostras de mel: cor, pH, acidez total, humidade, condutividade elétrica, teor em cinzas, HMF, diástase, teor em sacarose e teores em fenóis e flavonoides

3.3 – Caracterização Físico-Química

3.3.1 - Cor

A cor do mel está relacionada com o tipo de pólenes presentes no mel e é medida por espectrofotometria na zona do visível (absorvância) sendo posteriormente transformado num valor da escala de mm Pfund (ver secção 2.8). Na Figura 6 mostram-se os resultados da cor na escala mm Pfund, por ordem decrescente, obtidos nos méis usados neste trabalho, identificados pelos dois pólenes predominantes do respetivo perfil polínico. As letras diferentes indicam que os resultados médios são diferentes estatisticamente, usando a Anova de 1 fator.

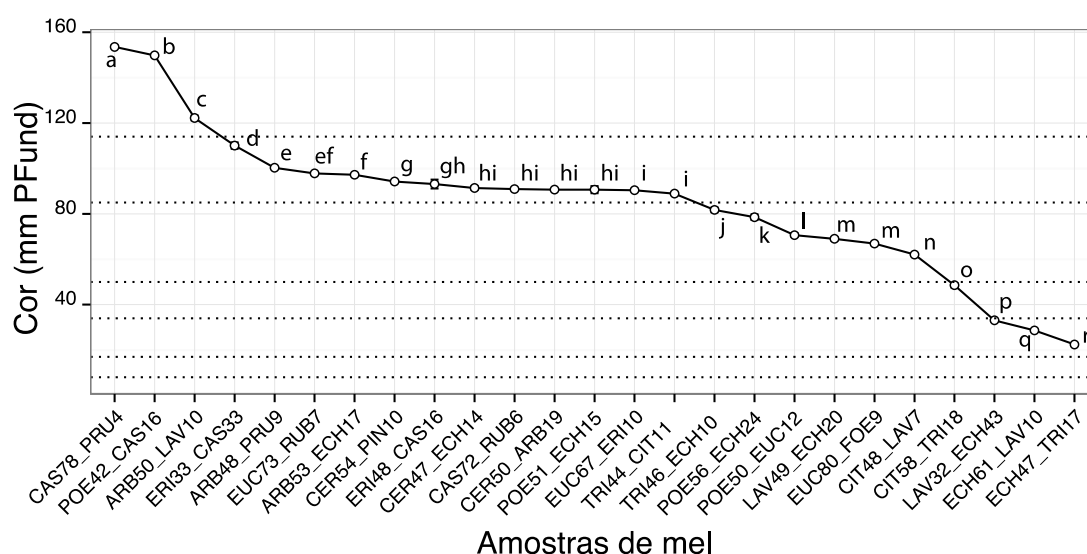



























Fig. 6 – Cor dos méis estudados na escala mm Pfund

Facilmente se consegue observar na figura que os valores mais altos (de mm Pfund) estão relacionados com os méis mais escuros, ricos em sais minerais, e à medida que a cor dos méis tende a ficar mais clara, os valores vão sendo mais baixos, há direita do gráfico. A figura mostra que os três valores mais baixos, associados à cor branca (cor < 29 mm Pfund), apresentam percentagem de pólen de *Echium sp.* superiores ou iguais a 43%, tendo

como pólen secundário, 32% em *Lavandula sp.* ou 17% de *Tryfolium sp.*. A amostra que contém 78% de pólen de *Castanea sativa* apresenta a cor mais escura (154 mm Pfund).

Na Tabela 6 apresentam-se, para cada amostra, os valores de cor na escala mm Pfund, a relação com a cor na zona do visível e o nome da cor identificada. Verifica-se que 3 méis são de cor branca (varia entre 22,5 e 33,1 mm Pfund), só um mel apresenta cor âmbar extra claro, 6 méis são de com âmbar claro (62.1 a 81,7 mm Pfund), 12 méis têm cor âmbar (88,9 a 110mm Pfund) e 3 amostras são de cor âmbar escuro (122.2 a 153.6 mm Pfund).

Tab.6: Amostras de mel separadas por mm Pfound e associação a sua cor respectiva.

Pólens Predominantes	Cor, mmPFund	Cor do mel	Nome da Cor
ECH47_TRI17	22.5		Branco
ECH61_LAV10	28.6		Branco
LAV32_ECH43	33.1		Branco
CIT58_TRI18	48.6		Âmbar extra claro
CIT48_LAV7	62.1		Âmbar claro
EUC80_FOE9	66.9		Âmbar claro
LAV49_ECH20	69.0		Âmbar claro
POE50_EUC12	70.6		Âmbar claro
POE56_ECH24	78.5		Âmbar claro
TOM46_ECH10	81.7		Âmbar claro
TOM44_CIT11	88.9		Âmbar
EUC67_ERI10	90.4		Âmbar
POE51_ECH15	90.7		Âmbar
ALF50_MED19	90.7		Âmbar
CAS72_RUB6	90.9		Âmbar
ALF47_ECH14	91.4		Âmbar
ERI48_CAS16	93.1		Âmbar
ALF54_PIN10	94.3		Âmbar
MED53_ECH17	97.2		Âmbar
EUC73_RUB7	97.9		Âmbar
POE48_PRU9	100.3		Âmbar
ERI33_CAS33	110.1		Âmbar
POE50_LAV10	122.2		Âmbar escuro
POE42_CAS16	149.8		Âmbar escuro
CAS78_PRU4	153.6		Âmbar escuro

Os pólenes predominantes tem elevada importância ao nível da caracterização da cor final do mel e é difícil obter as mesmas características em diferentes colheitas, mesmo sendo considerado mel monofloral pois, em cada colheita de mel o perfil polínico será diferente. Resultados obtidos em trabalho de dissertação de mestrado Sousa, Mara E.B.C

(2012) em “Língua eletrónica potenciométrica: uma ferramenta para análise da qualidade do mel.”, mostram a variação de cor desde o extra-branco até ao escuro, dentro do intervalo de 15,9 a 204,2 mm Pfund, segundo a escala definida pela USDA (Agricultural Marketing Service, United States Standards for Grades of Extracted Honey). Neste trabalho usaram-se 90 amostras de mel representantes de uma amostragem de varias regiões de Portugal tendo predominando as cores branco, âmbar claro e escuro foram as que predominaram (>22% de méis em cada categoria), enquanto que os méis de cor âmbar extra claro e âmbar estavam representados medianamente (11,2% para cada categoria). As amostras de cor extra branco foram as menos representativas (2,2%). Os resultados apresentados mostraram que é possível ter uma elevada variabilidade entre os méis, apesar da origem ser igualmente Portuguesa, pois cada amostra de mel possui a sua própria identidade e características únicas devido ao perfil polínico.

Com o objetivo de relacionar os resultados das seguintes análises físico-químicas com a cor das respetivas amostras, os resultados serão apresentados com a ordem decrescente de cor apresentada na Figura 6.

3.3.2 - pH

Os valores de pH deverão situar-se entre 3,2 e 4,5 (Feás *et al.*, 2010), pois nestas condições o crescimento microbiano fica condicionado pelo facto de não serem ótimas para o seu desenvolvimento, aumentando o tempo de armazenamento e de vida de prateleira. O crescimento de microrganismos interfere na qualidade do produto, ao nível da sua textura que sofre alterações, estabilidade e vida útil do mel, como consequência o seu sabor e aroma alteram-se de forma a ficar impróprio para consumo.

Na Figura 7 apresentam-se os valores de pH obtidos da análise a cada amostra de mel e as letras diferentes representam amostras com diferenças significativas na Anova de 1 fator.

Os valores de pH obtidos variaram entre 3,82 e 4,81, com uma média de 4,44, e seguem uma tendência decrescente com a ordem decrescente da cor do mel. Por isso, os valores de pH mais baixos observaram-se nas amostras que apresentaram pólen de *Echium sp.* e os dois valores mais altos nas que apresentaram elevados níveis de pólen de *Castanea sativa*.

Ao comparar os valores obtidos com os limites máximos Europeus segundo Persano Oddo *et al.*, (2004) verificou-se que os méis de ECH47_TRI17 e CAS72_PRU4

ultrapassaram o estipulado (pH mínimo de 3.90 e pH máximo de 4.70, respetivamente); o mesmo acontece com o mel CIT58_TRI18, onde o mínimo Europeu é de 3.30 e o máximo de 4.20; e, também, as amostras EUC80_FOE9 e EUC73_PRU9 com um mínimo Europeu de 3.70 e o máximo de 4.30; os restantes estão conforme os parâmetros Europeus. Relativamente aos méis alfarroba (*Ceratonia siliqua*), medronheiro (*Arbutus unedo*), poejo (*Mentha pulegium*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), os seus encontram-se entre valores de pH de 4,00 e 4,75, é de salientar que estes méis ainda não foram objeto de estudos e, por isso, não há termos de comparação.

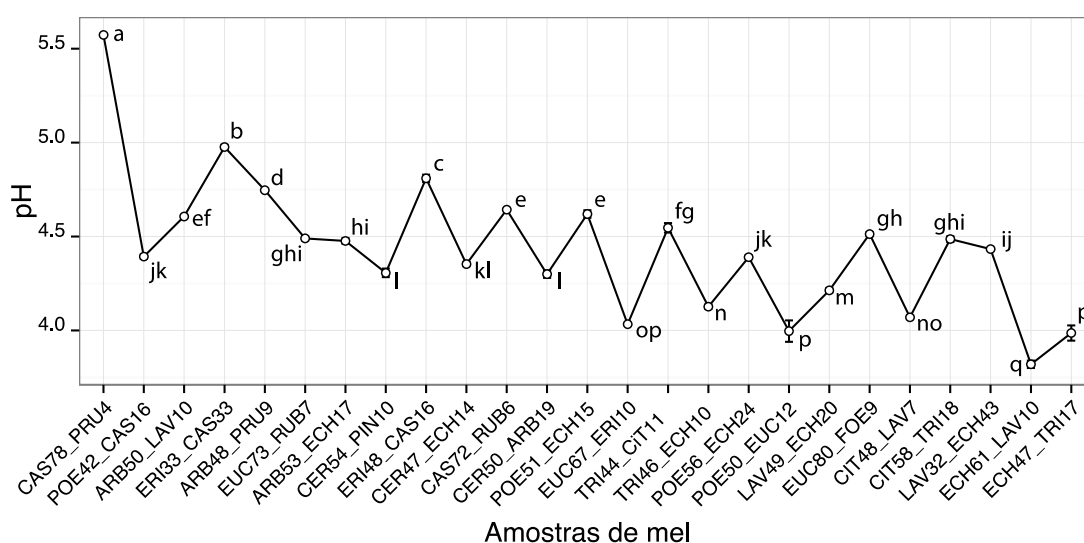


Fig.7 – Valores de pH de cada amostra de mel

De forma geral, os resultados médios obtidos apresentaram erros analíticos baixos e, por isso, os valores de pH e as outras variáveis físico-químicas, a seguir apresentadas, mostram diferenças significativas entre a maior parte das amostras.

3.3.4 – Acidez

A acidez livre no mel não é constante, uma vez que este possui enzimas que alteram os seus valores, tais como a glucose oxidase, e que se mantém ativas mesmo após a colheita do mel (Cavia *et al.*, 2007). Através dos valores da acidez é possível avaliar o estado de maturação e de deterioração do mel pois, logo que haja uma fermentação no mel, a acidez tende a aumentar.

Os valores obtidos nas amostras estudadas situam-se dentro dos parâmetros, o que indica a ausência de fermentações (Bogdanov *et al.*, 2004). Os valores obtidos estão apresentados na Figura 8 (letras diferentes representam amostras com diferenças significativas na Anova de 1 fator). A figura mostra que os méis de cor âmbar para cor branco apresentam valores de acidez decrescentes com a cor, mas para os méis mais escuros obteve-se, em geral, níveis similares de acidez (entre 25 e 35 meq/kg de mel), exceto 3 méis, sendo 2 dos méis de medronheiro. Salienta-se que se obtiveram a amostras com valores de acidez acima de 30 (meq/kg de mel) que, dispostas de forma crescente, foram: POE50_EUC12, CAS78_PRU4, TRI44_CIT11, ERI48_CAS16, POE50_EUC12 e EUC67_ERI10. As amostras LAV32_ECH43 e ECH61_LAV10 apresentaram valores abaixo de 15 meq/kg de mel.

De realçar que nenhum dos méis estudados ultrapassaram os valores Europeus para acidez nos méis: mínimo de 2.30 meq/kg de mel e máximo de 49.7 meq/kg de mel.

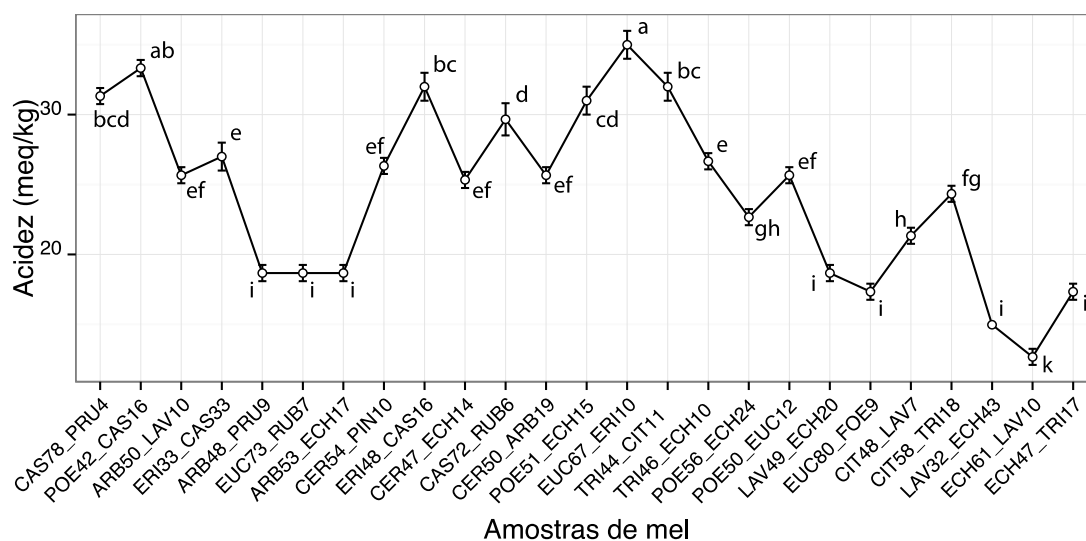


Fig.8 - Valores de acidez (meq/kg de mel) de cada amostra de mel

3.3.5 – Humidade

Na caracterização do mel, este parâmetro é o único critério comercial que o mel tem que cumprir. A percentagem de água tem de estar dentro dos limites máximos admissíveis pela legislação, inferiores a 20%, caso contrário, não é aceite no comércio mundial, no caso da Europa o limite máximo é de 21,4 %. Níveis baixos de humidade no mel é sinónimo de uma melhor conservação e armazenamento, o que leva a um aumento do tempo vida de prateleira deste produto. Está referido que, se a atividade da água for baixa,

as condições de crescimento microbiano serão desfavoráveis, impedindo o crescimento à superfície de fungos tais como *Penicillium* spp e *Mucor* spp (Estevinho *et al.*, 2012).

Na Figura 9 mostram-se os valores de humidade (%) obtidos nos méis analisados, verificando-se que a maior parte das amostras apresentam valores médios a variar entre 14,5 a 15,5 %. Nas amostras, o valor mais baixo encontrado foi no mel de POE42_CAS16 (12,6 %) e o mais alto no mel ERI33_CAS33 (16,8 %), o que indica que estão dentro dos parâmetros Europeus. Curiosamente, o limite máximo para méis Europeus de 21,40% é relativo ao mel de Urze, tal como o valor mais alto obtido neste estudo em ERI33_CAS33.

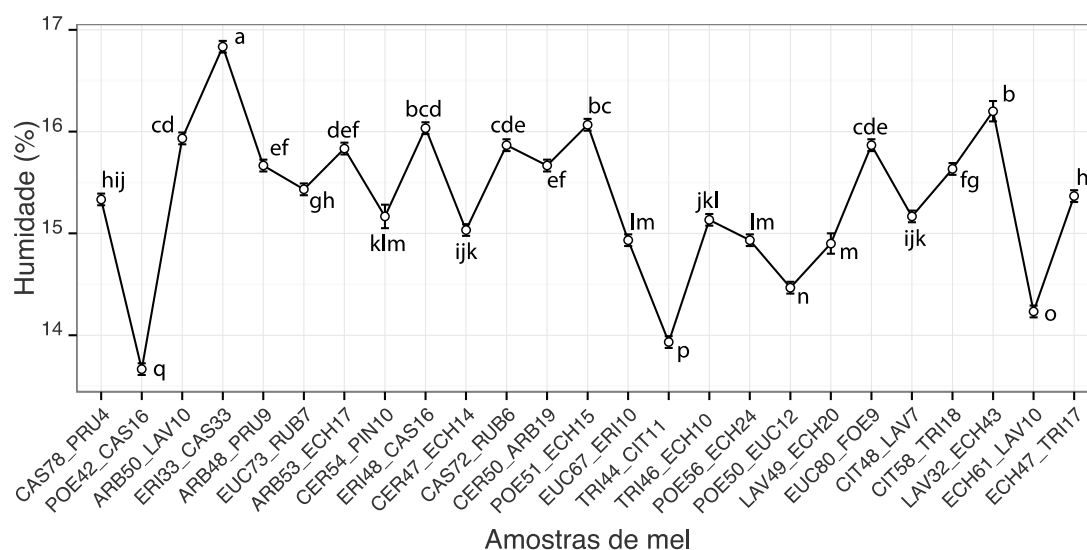


Fig.9 - Valores de humidade (%) presente em cada amostra de mel

Através da análise da Figura 9, que apresenta valores médios e barras associadas ao desvio padrão das análises, foi visível que as médias da humidade de algumas amostras foram estatisticamente iguais (letras diferentes representam amostras com diferenças significativas na Anova de 1 fator): no caso dos méis EUC67_ERI10, LAV49_ECH20 e POE56_ECH24 com uma humidade a rondar os 14,9 %; méis CIT48_LAV7, CER54_PIN10 e TRI46_ECH10 com valores próximos de 15,2%; méis CAS78_PRU4 e ECH47_TRI17 com valores próximos de 15,4%; méis CAS72_RUB6, ARB50_LAV10 e EUC80_FOE9 com resultados de 15,9%; e, por ultimo, méis ERI48_CAS16 e POE50_EUC12 com valores próximos de 16,0%. Os restantes resultados são casos isolados pois não mostram semelhanças estatísticas com outras amostras.

3.3.6 – Cinzas totais e Condutividade elétrica

A condutividade elétrica depende da concentração de sais minerais, ácidos orgânicos e proteínas presentes nos néctares recolhidos pela abelha e que deu origem ao mel (Acquarone *et al.*, 2007). Estudos realizados (Felsner *et al.*, 2004; Kropf *et al.*, 2008) mostraram que existe uma relação linear entre o teor mineral e a condutividade elétrica. O teor de cinzas dá uma medida direta do resíduo inorgânico após carbonização, enquanto a condutividade elétrica mede todas as substâncias orgânicas e inorgânicas ionizáveis presentes no mel (Estevinho *et al.*, 2012). O teor de cinzas e a cor do mel estão relacionados, uma vez que os méis com cor clara têm geralmente um teor de cinzas inferior ao dos méis de cor escura (Finola *et al.*, 2007).

Na Figura 10 mostra-se o gráfico dos valores médios (com barras de erros) de condutividade (10^{-4} S cm^{-1}) obtidos de cada amostra de mel (letras diferentes representam amostras com diferenças significativas na Anova de 1 fator). Neste estudo, as cinzas não foram determinadas experimentalmente e, como referido na secção 2.6 (pag.18), foram calculadas por uma relação com a condutividade, pelo que, no presente estudo não foi apresentado um gráfico similar ao da condutividade (Figura 10) para os resultados das cinzas.

A Figura 10 mostra que os méis de *Echium* (ECH47_TRI17 e ECH61_LAV10) tiveram os valores mais baixos de condutividade (10^{-4} S cm^{-1}) e que são esperados por serem méis de cor branca, indo de encontro aos resultados obtidos em estudos anteriores (Finola *et al.*, 2007; Felsner *et al.*, 2004; Kropf *et al.*, 2008).

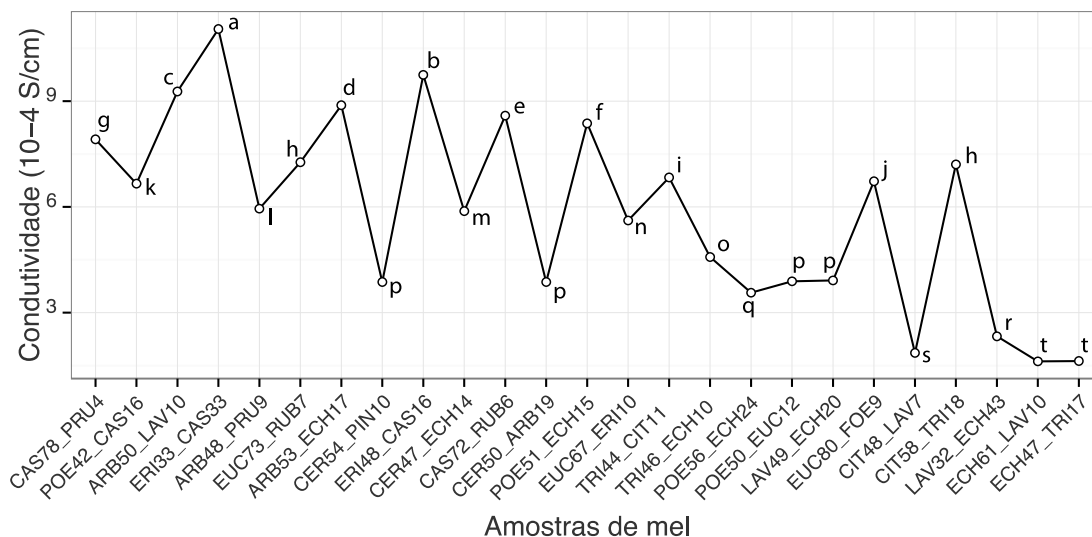


Figura 10 - Valores de condutividade (10⁻⁴ S cm⁻¹) presente em cada amostra de mel

Os valores Europeus de condutividade elétrica nos méis variam entre 0,08 e 1.91 (10⁻⁴ S cm⁻¹). Nas amostras analisadas, o valor máximo foi de 1.10 (10⁻⁴ S cm⁻¹) relativo ao mel de ERI35_CAS33 e, por isso, todas as amostras enquadraram-se nos parâmetros Europeus.

Os valores médios da condutividade mostram uma tendência decrescente em relação ao decrescimento da cor (mm Pfund), o que está de acordo com os resultados obtidos nos estudos de Felsner *et al.* (2004) e Kropf *et al.* (2008). Um comportamento semelhante foi obtido nos resultados de pH.

3.3.7 - Índice diastásico

O índice diastásico é um indicador de frescura do mel e está associado aos níveis das enzimas diástase, cuja ação diminui com o tempo de armazenamento e com o aquecimento do mel. A diminuição da diástase pode estar relacionada com a sua desnaturação pela exposição a temperaturas superiores a 35°C durante o armazenamento e/ou o seu tempo de vida na prateleira (Alves *et al.*, 2012).

A Figura 11 mostra os valores médios (com barras de erros) de índice diastásico (mg/g/min) obtidos em cada amostra de mel (letras diferentes representam amostras com diferenças significativas na Anova de 1 fator).

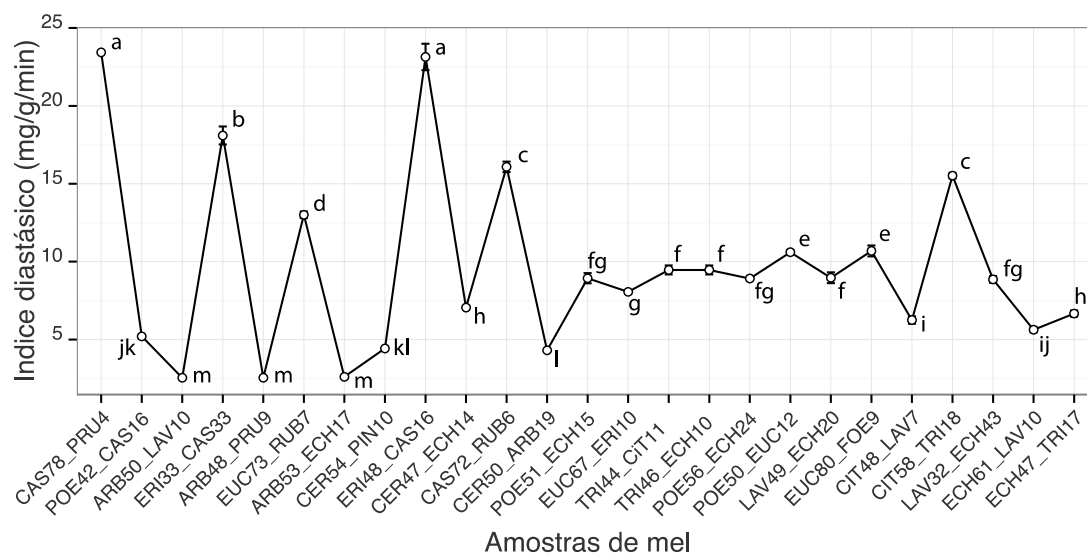


Figura 11 - Valores de índice diastásico (mg/g/min) de cada amostra de mel

A figura mostra uma variação elevada nos resultados obtidos em mel de cor mais escura enquanto que, nos méis de cor mais clara, os valores de índice diastásico são mais regulares, verificando-se que vários méis apresentam resultados estatisticamente semelhantes.

Os resultados mais elevados (valores superiores a 16,00 mg/g/min) pertencem às amostras que têm pólen de Castanheiro no seu perfil polínico maioritário (CAS78_PRU4, ERI35_CAS33, ERI48_CAS16 e CAS72_RUB6). Verificou-se também que os valores mais baixos pertencem às amostras de mel de Medronheiro (ARB50_LAV10; ARB48_PRU9 e ARB53_ECH17) e com valores estatisticamente iguais.

3.3.8 – HMF

O composto HMF forma-se mesmo após o armazenamento do mel a baixas temperaturas. A presença de açúcares simples e água, em meio ácido, favorece a formação de HMF (Nozal *et al.*, 2001), embora em armazenamento as suas concentrações aumentam com o aumento da temperatura e tempo de armazenamento. O aumento excessivo de HMF traduz-se em perda de qualidade associado a envelhecimento e possíveis riscos para a saúde dos consumidores. Segundo o estudo de Louise *et al.* (2010), o HMF está entre as substâncias de risco de atividade mutagénica, cito-toxicidade e genotoxicidade.

A Figura 12 mostra a variação dos níveis médios (com barras de erros) de HMF encontrados nas amostras de mel estudadas e os resultados comparativos com Anova de 1 fator (letras diferentes representam amostras com diferenças significativas).

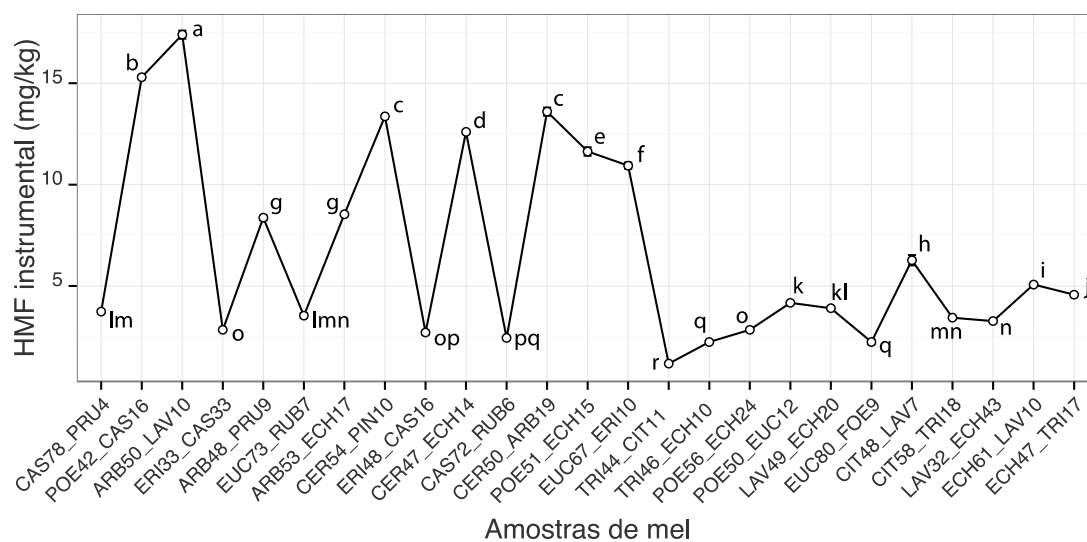


Figura 12 - Valores de HMF (mg/L) em cada amostra de mel

Esta figura apresenta um comportamento semelhante ao obtido nos resultados de índice diastásico: variação elevada nos méis de cor mais escura e, nos méis de cor mais clara, valores mais regulares. Com valores acima de 13,0 mg HMF/L encontram-se 4 amostras de mel: ARB50_LAV10, POE42_CAS16, CER47_ECH14 e CER54_PIN10. Com valores abaixo de 2,5 mg/L existem 3 amostras: CAS72_RUB6 e as duas com pólen de tomilho, TRI44_CIT11 e TRI46_ECH10. Verificou-se que o valor mais elevado foi observado na amostra ARB50_LAV10 com valor de 17.4 mg/l e o valor mais baixo no mel TRI44_CIT11 (1.2 mg/l). Convém salientar que para os méis de alfarroba, medronheiro, poejo e tomilho não existem parâmetros mínimos e máximos legais. Pelo contrário, de referir que o mel CAS72_RUB6 tem valores acima do limite máximo Europeu permitido para um mel de Castanheiro.

3.3.9 – Conteúdo em compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são fundamentais na alimentação humana, que além da sua função antioxidante, apresentam também outras propriedades biológicas, nomeadamente propriedades anti-histamínica, anti-inflamatória, antibacteriana e antiviral (Perron *et al.*, 2009). Os ácidos fenólicos que se encontram em maiores quantidades no mel são os

ácidos gálicos e p-cumárico, embora estejam outros presentes em menor quantidade, como os ácidos cafeico, ferúlico, elágico, clorogénico, siríngico, vanílico e p-hidroxibenzóico (Estevinho *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos variam em composição e quantidades em cada amostra de mel pois dependem do perfil polínico e origem geográfica do mel.

Na Figura 13 visualizam-se os conteúdos médios (com barras de erros) em compostos fenólicos (mg de GAE/100g de mel) obtidos para cada amostra e os resultados comparativos da Anova de 1 fator (letras diferentes representam amostras com diferenças significativas). Como se pode verificar, os conteúdos em fenóis mostraram um comportamento semelhante ao obtido na avaliação dos valores de pH e condutividade, ou seja, os resultados mostram valores decrescentes em relação à ordem decrescente da cor das amostras analisadas. A figura mostra que o valor mais elevado obtido foi no mel de CAS78_PRU4 com 116,4 mg de GAE/100g de mel e o mais baixo no mel de ECH61_LAV10, com 23,3 mg de GAE/100g de mel. Verifica-se também que as 8 amostras apresentaram valores acima de 100,0 mg de GAE/100g de mel foram CAS72_RUB6, CAS78_PRU4, ERI48_CAS16, ERI35_CAS33, ARB50_LAV10 (Med1), ARB48_PRU9, ARB53_ECH17 e POE42_CAS16. Ou seja, os méis mais ricos em compostos fenólicos são os de castanheiro, urze e medronheiro. O mel de poejo MEN42_CAS16 mostra também valores elevado, talvez devido à influência do néctar de castanheiro.

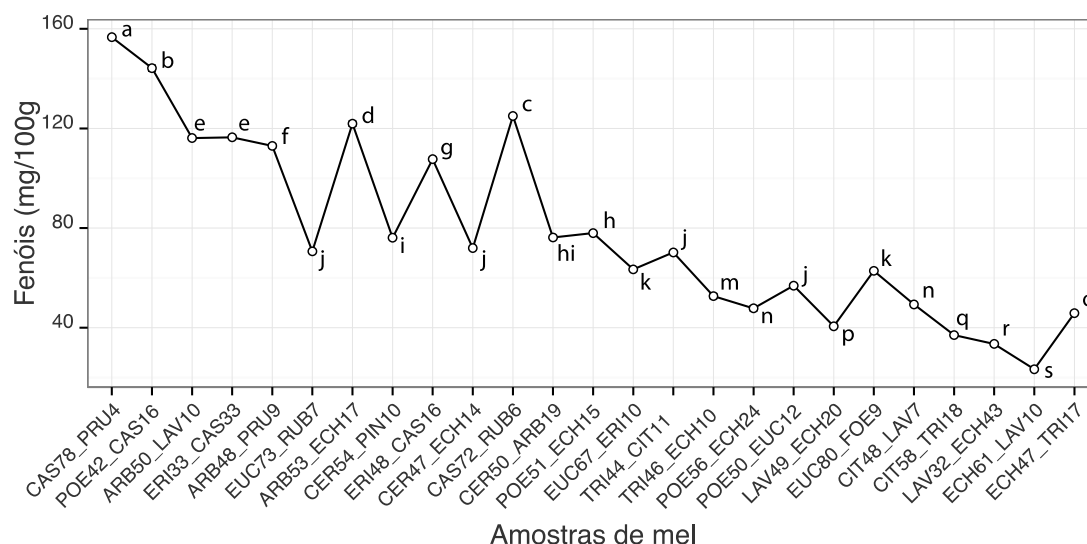


Fig.13 – Conteúdo em compostos fenólicos (mg de GAE/100g) de cada amostra de mel

3.3.10 – Conteúdo em flavonoides

Os compostos flavonoides fazem parte dos compostos fenólicos e são substâncias antioxidantes com efeitos benéficos para a saúde. Cada amostra de mel pode apresentar uma composição e quantidades em compostos flavonoides diferente pois está dependente da sua origem geográfica, bem como do seu perfil polínico. Nas plantas a função dos flavonoides é atrair insetos para ajudar na polinização e na dispersão de sementes devido as suas cores brilhante e padrões (Carpes, 2008).

Na Figura 14 visualizam-se os conteúdos médios e as respectivas barras de erros, em compostos flavonóides (mg de CAE/100g de mel) obtidos para cada amostra, bem como, os resultados comparativos da Anova de 1 fator (letras diferentes representam amostras com diferenças significativas). A figura não mostra a mesma tendência que foi encontrada em relação aos níveis de compostos fenólicos. Nos méis mais escuros obteve-se um decréscimo nos conteúdos em flavonoides, seguindo-se de 3 méis com valores baixos (< 5 mg de CAE/100g de mel) típicos dos méis com cores mais baixas. Na zona intermédia de cores houve oscilação dos valores baixos para valores elevados devido à presença de méis com pólen de urze, castanheiro e poejo.

Da análise da figura verificou-se que os méis CAS78_PRU4, POE42_CAS16, ERI35_CAS33, ERI48_CAS16, POE51_ECH15, ARB50_LAV10 e CAS72_RUB6 apresentaram os valores mais elevados, acima de 9,0 mg de CAE/100g de mel. As restantes amostras de mel têm valores de flavonoides entre os 6,0 e os 2,0 mg de CAE/100g de mel. O valor mais elevado em conteúdo de flavonoides foi obtido no mel CAS78_PRU4 (19,8 mg de CAE/100g de mel) e o mais baixo no mel ECH61_LAV10, com 3,5 mg de CAE/100g de mel.

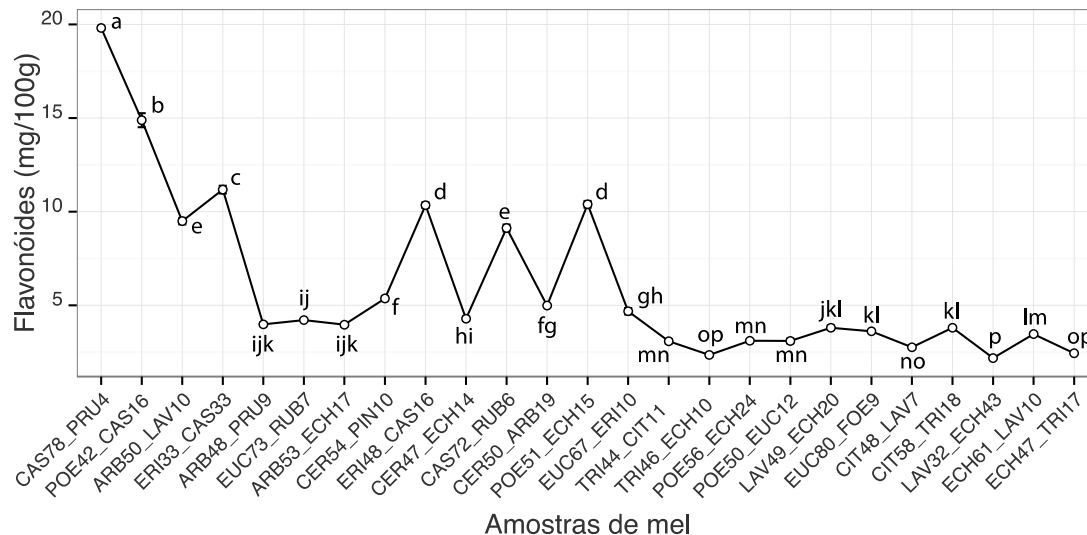


Fig.14 – Conteúdo em compostos flavonoides (mg de GAE/100g) de cada amostra de mel

3.3.11 – Açúcares Redutores

Os açúcares presentes no mel têm de estar de acordo com a Legislação Portuguesa (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro), que refere que o teor mínimo de glucose e de frutose no mel de néctar é de 60% (p/p).

Na Figura 15 visualizam-se os valores médios de percentagem de açúcares redutores obtidos, com as barras de erros, para cada amostra e os resultados comparativos da Anova de 1 fator (letras diferentes representam amostras com diferenças significativas). A figura mostra que a maioria méis apresentam valores elevados e só 4 amostras se encontram abaixo dos 60% as amostras de CAS78_PRU4, CIT48_LAV7, CIT58_TRI18 e POE50_EUC12, sendo o valor mais baixo observado no mel CAS78_PRU4 (54.4 %). Com percentagem intermedia entre 60% e 65%, obtiveram-se 3 méis: ECH61_LAV10, ERI48_CAS16 e POE56_ECH24. As restantes amostras tiveram valores acima dos 65% e estatisticamente semelhantes, tendo-se obtido no mel EUC80_FOE9, o valor mais elevado, a concentração de 73.3 % em açúcares redutores.

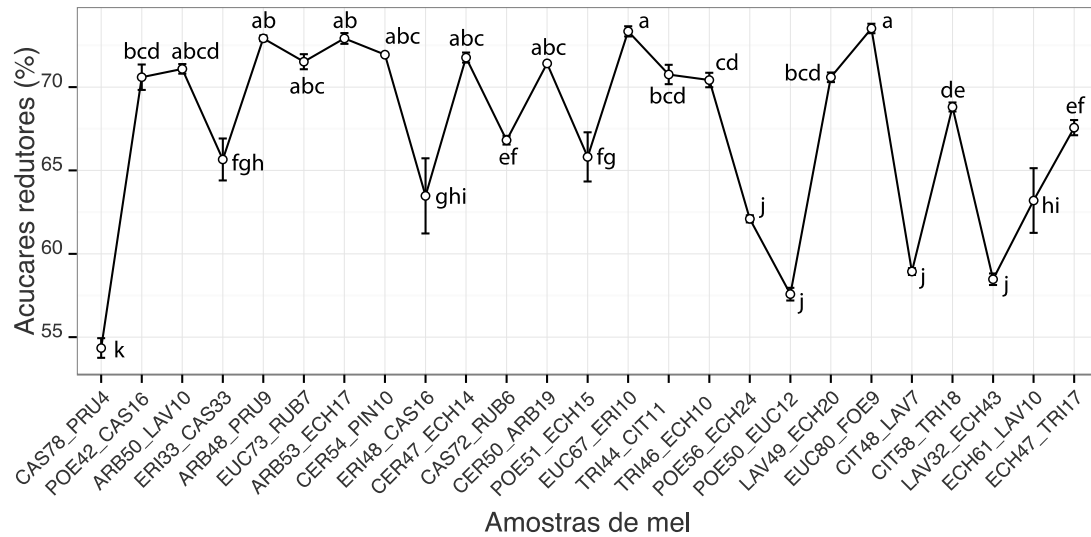


Fig.15 – Açúcares redutores (%) em cada amostra de mel

Globalmente, os resultados salientam a elevada variabilidade encontrada nas características físico-químicas dos méis analisados, como se pode verificar pela variabilidade encontrada na análise individual de cada variável físico-química, mostrando que mesmo os méis monoflorais do mesmo tipo de pólen apresentam variações significativas nas suas características. Com o objetivo de avaliar a variabilidade presente nos resultados físico-químicos de forma global, a seguir aplica-se um método de análise multivariada não supervisionada de análise exploratória: análise de agrupamentos estatísticos.

3.4 – Análise de agrupamentos estatísticos

A análise de agrupamentos estatísticos (MDS, “multidimensional scaling”) representa dados de proximidade (isto é, medidas de similaridade, proximidade, relação, etc.) entre amostras, ou seja, distâncias entre pontos num espaço multidimensional (geralmente bidimensional). A melhor estrutura das proximidades entre as amostras é obtida iterativamente e se o ajuste da solução MDS é bom, através de representação gráfica é possível interpretá-lo em termos de conteúdo. A distância entre duas amostras representa, em geral, (com bastante precisão) a correlação das respetivas variáveis que as caracterizam. Usou-se MDS métrico que usa distâncias entre os dados originais, de forma a que nenhuma informação significativa dos dados é perdida. A função de distância usada foi a distância euclidiana, pois corresponde à noção natural de distância entre pontos "em linha reta", implicando uma geometria plana. O modelo MDS é geralmente usado como técnica exploratória, onde os pontos representativos das amostras são posicionados no espaço associados às distâncias resultantes que representam o melhor possível os dados.

O modelo obtido, representativo das diferenças obtidas nas características físico-químicas entre as amostras, mostrou ser um ajuste significativo (valor de $p < 0,001$), com o coeficiente de correlação de valor 0,994, ou seja, a solução MDS representa bem os dados físico-químicos. Na Figura 16 mostra-se a solução bi-dimensional do modelo de MDS obtido, repetido 3 vezes de forma a identificar as amostras com três legendas: os dois pólenes predominantes, a classificação do mel em mono/multifloral e a cor em unidades de mm de PFund. A figura mostrou que a dimensão 1 permitiu uma maior distinção entre amostras (amostras com valores a variar entre -105 e +93), indicativo que as amostras mostraram elevadas diferenças nesta dimensão. Aliás, é possível verificar que nesta dimensão predomina o efeito da cor pois, os méis de cor mais claros (valores baixos na escala mm de Pfund) apresentam-se a coordenadas de valores positivos mais elevados e os de cor escura, a valores mais negativos. A dimensão 2 mostrou uma menor separação entre as amostras (amostras com valores a variar entre -27 e +18), onde é evidente que a cor não é um fator de separação uma vez que, os valores distribuídos no espaço são aleatórios. A separação das amostras nesta dimensão pode ser atribuída às diferenças no perfil polínico que está parcialmente representado pelos dois pólenes predominantes e pela classificação do mel em mono/multifloral (considerando o pólen mais predominante).

Considerando a dimensão 1, verificou-se que os méis que apresentaram valores altos de cor foram os classificados como multiflorais (M), seguidos dos méis de medronheiro e urze, que na dimensão 2 estão ligeiramente afastados, sendo justificado pelas diferenças no perfil polínico, que está parcialmente representado no segundo pólen predominante. No quadrante positivo da dimensão 1, os méis claros os méis classificados como de soagem, lavandula e laranja mostraram pequena variabilidade, exceto na dimensão 2 pela mesma razão. Esta situação foi obtida também nos méis situados na zona intermédia da dimensão 1, como por exemplo, nos méis de eucaliptos. Os méis de alfarroba estão muito próximos quer na dimensão 1 quer na dimensão 2, mesmo com diferenças acentuadas no perfil polínico, podendo ser indicativo que o néctar desta planta tem características que se sobrepõe às das restantes plantas (associadas aos pólenes presentes no respetivo perfil polínico). Os méis de poejo apresentam características gerais mais próximas dos méis de lavandula e de laranja, que foram analisados neste trabalho. As duas amostras de mel de tomilho apresentam características físico-químicas próximas de méis monoflorais de eucaliptos. Estes dois tipos de méis também mostraram homogeneidade nos resultados analíticos. De salientar que os méis de alfarroba, poejo e tomilho apresentaram menos variabilidade no espaço bi-dimensional obtido por MDS, estando próximos entre si, que os méis de medronheiro.

Globalmente, estes resultados salientam o facto que os méis apresentaram uma cor com variações, mas que pode ser maioritariamente atribuída à elevada percentagem associada ao seu pólen mais predominante. No entanto, as características físico-químicas entre os méis monoflorais, mesmo para os méis com o mesmo pólen predominante, variam significativamente. Estas variações são justificadas pela diferenciação dos méis no restante perfil polínico.

Por isso, considera-se que a caracterização de um mel seria mais efetiva, em termos de justificação da variabilidade encontrada nas amostras estudadas, se a categorização refletisse os dois pólenes predominantes. Embora o consumidor não esteja “formado” nestas variações da composição polínica, o mel comercial teria uma mais valia ao fornecer informação mais completa da sua qualidade e, neste âmbito, considera-se que seria de incluir nos rótulos do mel comercial a classificação tradicional baseada somente na percentagem do pólen mais predominante (mel mono ou multifloral), bem como, a percentagem dos dois pólenes predominantes.

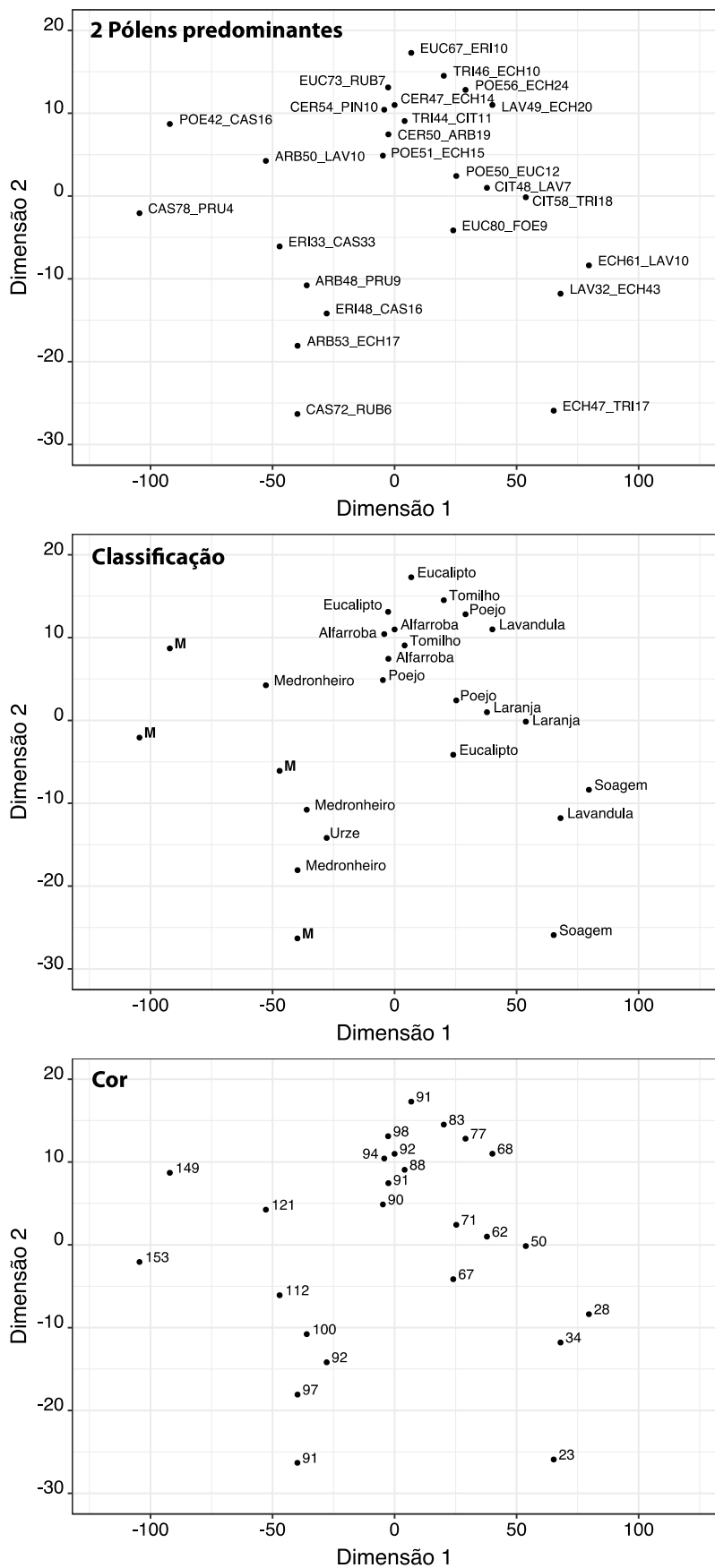


Figura 16 – Representação bi-dimensional do modelo MDS obtido usando três legendas: os dois pólenes predominantes, a classificação do mel em mono/multifloral e a cor em unidades de mm de PFund.

3.5 – Análises microbiológicas

Os resultados obtidos para os parâmetros microbiológicos apresentam-se na Tabela 6, estando a negrito os valores de contagem superiores a 10. Verifica-se que os microrganismos *Staphylococcus aureus*, Coliformes totais, *Escherichia coli*, *Clostridium sp* e *Salmonella sp* estavam ausentes (<10 UFC/ g de mel) em todas as amostras de mel analisadas.

Para visualizar os níveis baixos de contaminação microbiológica apresenta-se a Figura 17, que mostra os resultados médios obtidos para os microrganismos presentes nas amostras de mel, incluindo as barras de erro.

Os microrganismos Aérobios Mesófilos e Bolores/Leveduras estavam presentes em 68% e 76 % das amostras analisadas, respetivamente. No caso dos Mesófilos encontraram-se valores médios >100 UFC/g de mel, nas amostras de MEN56_ECH24, LAV32_ECH43 e EUC67_ERI10, embora o valor mais elevado seja de >145 UFC/g de mel para este último mel. Para os Bolores e Leveduras são encontrados valores mais elevados (>200 UFC/g de mel) em MEN56_ECH24, TRI44_CIT11, ARB48_PRU9 e CER50_ARB19, tendo-se obtido o valor mais elevado no mel ARB48_PRU9 (>250 UFC/g de mel). Verificou-se que só os méis ARB48_PRU9 e MEN56_ECH24 tiveram a presença simultânea destes 3 tipos de microrganismos. De salientar que só em 3 méis (CER54_PIN10, TRI46_ECH10 e ERI48_CAS16) não se verificou a presença de qualquer um dos microrganismos analisados, com níveis superiores a >10 UCF/g de mel.

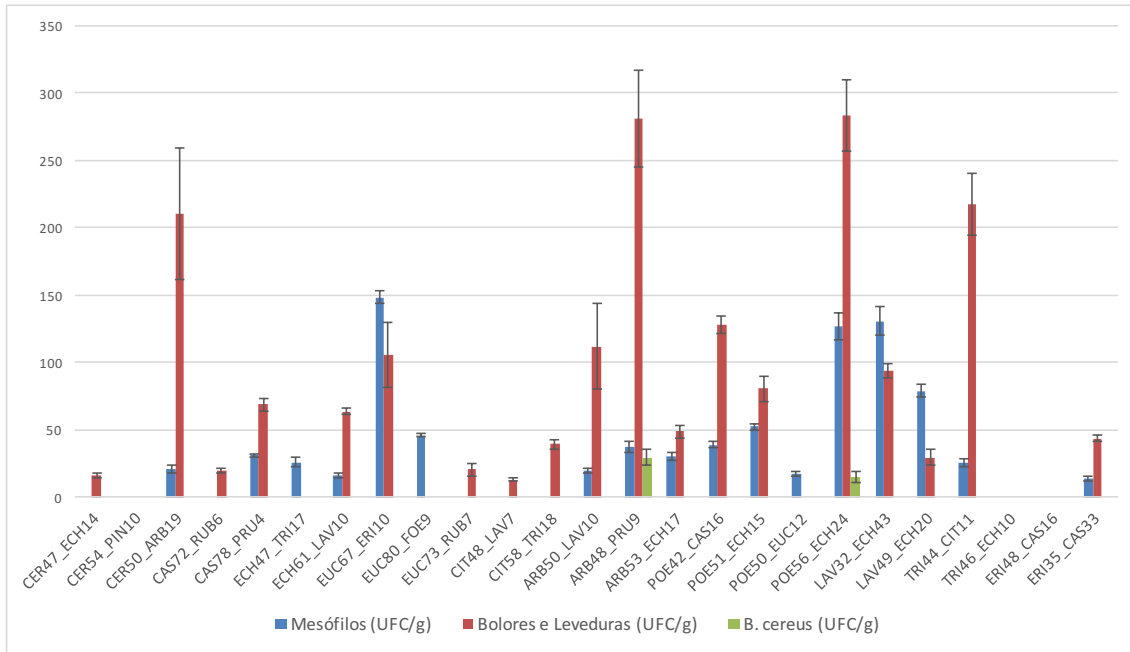
Globalmente os resultados mostram que os méis analisados apresentam presença de microrganismos não patogénicos, indicativo de serem produtos de qualidade para consumo humano.

Tab.6: Resultados das análises microbiológicas *1

Amostra *2		Mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>Staphylo. aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	<i>Clostridium sp</i> (in 0.01 g)	<i>Salmonella sp</i> (in 25 g)
Eri1	R1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Eri2	R1	12	45	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	15	42	<10	<10	<10	<10	<10
Ech1	R1	23	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	28	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Ech2	R1	15	65	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	17	62	<10	<10	<10	<10	<10
Cas1	R1	<10	21	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	<10	18	<10	<10	<10	<10	<10
Cas2	R1	30	65	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	32	72	<10	<10	<10	<10	<10
Poe1	R1	37	123	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	41	132	<10	<10	<10	<10	<10
Poe2	R1	54	87	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	50	74	<10	<10	<10	<10	<10
Poe3	R1	16	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	18	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Poe4	R1	120	265	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	134	302	<10	<10	<10	<10	<10
Lar1	R1	<10	12	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	<10	14	<10	<10	<10	<10	<10
Lar2	R1	<10	37	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	<10	42	<10	<10	<10	<10	<10
Ros1	R1	138	98	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	123	90	<10	<10	<10	<10	<10
Ros2	R1	76	34	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	82	25	<10	<10	<10	<10	<10
Tom1	R1	23	234	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	27	201	<10	<10	<10	<10	<10
Tom2	R1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Euc1	R1	145	123	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	152	89	<10	<10	<10	<10	<10
Euc2	R1	45	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	47	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Euc3	R1	<10	24	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	<10	17	<10	<10	<10	<10	<10
Med1	R1	18	134	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	21	89	<10	<10	<10	<10	<10
Med2	R1	34	256	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	40	307	<10	<10	<10	<10	<10
Med3	R1	28	45	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	32	52	<10	<10	<10	<10	<10
Alf1	R1	<10	17	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	<10	15	<10	<10	<10	<10	<10
Alf2	R1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Alf3	R1	19	245	<10	<10	<10	<10	<10
	R2	23	176	<10	<10	<10	<10	<10

*1) <10 é indicativo de presença não significativa de microrganismos ; *2)R1 e R2 representam as duas réplicas efetuadas

Figura 17 – valores de contagem (UFC/g) dos microrganismos presentes nas amostras de mel.



3.6 – Conclusão

Os méis estudados neste trabalho eram monoflorais, com exceção de 4 méis, e apresentavam uma grande variação no perfil polínico. Com esta variação era esperada a variação experimental encontrada nas características físico-químicas dos méis analisados.

As cores dos méis foram as esperadas de acordo com a classificação do mel e em geral os valores das propriedades físico-químicas estão de acordo com a legislação Europeia.

Foram obtidas algumas exceções como no caso dos valores de pH, para os 5 méis ECH47_TRI17, CAS72_PRU4, CIT58_TRI18, EUC80_FOE9 e EUC73_PRU9; valor de HMF, no mel CAS72_RUB6 (mel de Castanheiro); valor de açúcares redutores em 4 méis CAS78_PRU4, CIT48_LAV7, CIT58_TRI18 e POE50_EUC12. De salientar que para os méis de alfarroba, medronheiro, poejo e tomilho não existem parâmetros mínimos e máximos legais, pelo que a avaliação dos resultados obtidos para estes méis não foi possível.

No estudo da variabilidade global presente nos resultados físico-químicos usou-se a análise de agrupamentos estatísticos (MDS, “multidimensional scaling”). As amostras de mel foram distribuídas num novo espaço bi-dimensional definido pelo modelo MDS definido, onde a primeira dimensão foi explicada pela cor do mel e a segunda dimensão, pelo perfil polínico, representado pelo dois pólenes mais predominantes. Foi possível verificar que as variações na cor do mel podem ser maioritariamente atribuídas à elevada percentagem associada ao seu pólen mais predominante, mas nas propriedades físico-químicas entre os méis, mesmo para os méis com o mesmo pólen predominante, a variação deve-se à diferenciação dos méis no perfil polínico. Os resultados mostraram que os méis de alfarroba, poejo e tomilho são semelhantes nas variáveis físico-químicas analisadas, enquanto que as dos méis de medronheiro se aproximaram principalmente dos méis com o pólen predominante de *Erica*.

Os resultados das análises microbiológicas às amostras mostraram a ausência de contaminações com *Staphylococcus aureus*, Coliformes totais, *Escherichia coli*, *Clostridium sp* e *Salmonella sp*, mostrando que os méis estudados apresentam qualidade para consumo humano. Verificou-se a presença dos microrganismos Aérobios Mesófilos e Bolores/Leveduras, mas em níveis baixos mostrando, também, a qualidade do mel analisado.

De salientar que o presente trabalho mostrou a importância das análises polínicas nos estudos com mel de forma a perceber as variações nas suas características e composição. Como trabalho futuro, sugere-se o estudo de caracterização dos méis de alfarroba, medronheiro, poejo e tomilho que, devido à esperada variabilidade em amostras monoflorais, mesmo sendo do mesmo pólen predominante, deve ser efetuada com o maior número de amostras possíveis e com diferentes origens geográficas de forma garantir a maior variabilidade possível e estabelecer intervalos característicos para os parâmetros físico-químicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, 101, 695-703.
- Acquarone, C.A. (2004). Parámetros fisicoquímicos de mieles, relación entre los mismos y su aplicación potencial para la determinación del origen botánico y/o geográfico de mieles argentinas. Tesis Licenciatura en tecnología de Alimentos. Buenos Aires. Universidad de Belgrado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Aljadi, A.M. e Yusoff, K.M. (2003). Isolation and Identification of Phenolic Acids in Malaysian Honey with Antibacterial Properties, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 33, 229-236.
- Almeida D. 2007. Recursos Alimentares, desenvolvimento das colônias e características Físico-Químicas, Microbiológicas e Polínicas de mel e cargas pólen de Meliponíneos do Município de Piracicaba, Estado de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz. Piracicaba.
- Anónimos (1986). Métodos oficiales de análisis para la miel. Orden de 12 de Junio de 1986 de la Presidencia del Gobierno, “Boletín Oficial del Estado” nº 145 de 18 de Junio de 1986. XXIII – Edulcorantes naturales y derivados.
- Alves, E.M., Fonseca, A.A.O., Santos, P.C., Bitencourt, R.M., Sodr e, G.S., Carvalho, C.A.L. (2012). Estabilidade fisico-química e sensorial de méis desumidificado de *Tetragonisca angustula*. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, 24, 185-193.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549–562.
- AOAC (2005). Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Arnaud, A.F., Silva, R.A., Araújo, L.L.S., Júnior, R.J.S., Junior, D.A.O. (2008). Perfil sensorial de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (hymenoptera, apidae) produzidos na microrregião de Catolé do Rocha – PB. *Revista Verde de Agroecologia e 80 Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA)*, 3, 73-85.
- Arráez-Román, D., G mez-Caravaca, A.M., G mez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1648–1656.
- Arruda, O.I. (2003). Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 9 (20), 523-524.

- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101, 502-514.
- Bastos, D.H.M., Franco, M.R.B., Da Silva, M. A.A.P., Janzanti, N.S., Marques, M.O.M. (2002). Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22 (2), 122-129.
- Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M. and Mariolo, J.M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, 124, 375–381.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Oriolia, M., Facino, R.M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric /fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185–191.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and color of Slovenian honey, *Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry*, 105, 822-828.
- Bogdanov, S. (2009). Honey Composition. *Book of Honey*, chap. 5. Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27 (6), 677-89.
- Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C. (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, 28, 1-59.
- Bogdanov, S., Ruoh, K., Oddo, L.P. (2004). Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, S4-S17.
- Bonvehí, S. J., Coll, V.F. (2003). Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 275-282.
- Borg, I., Groenen, P.J.F., Mair, P. (2013). *Applied Multidimensional Scaling*. Springer.
- Capuano, E., Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 793-810.
- Carpes, S. (2008). Estudo das Características Físico-Químicas e Biológicas do Pólen Apícola de *Apis mellífera* L. da região Sul do Brasil. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Casaca, J. (21 de Novembro de 2012). O Sector Apícola Nacional e Internacional: potencialidades do sector e comercialização. Federação Nacional dos Apicultores de Portugal.
- Castro-Vasquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., Pérez-Coello, M.S. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme

- and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, 112, 1022-1030.
- Cavia, M.M., Fernández-Muiño, M.A., Alonso-Torre, S.R., Huidobro, J.F., Sancho, M.T. (2007). Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food Chemistry*, 100, 1728-1733.
- Crane, E. (1983). *O livro do mel*. São Paulo: Nobel.
- Cramp, D. (2008). *A Practical Manual of Beekeeping, how to keep Bees and develop your full potential as an apiarist*. How To Books, Ltd. Spring Hill House, United Kingdom. 329 pp.
- Decreto-Lei n.º 131/1985, de 29 de Abril. *Diário da República Iª Série A*.
- Decreto-Lei n.º 214/2003, de 18 de Setembro. *Diário da República Iª Série A*.
- Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M., Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, 112, 329-338.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3774-3779.
- Estevinho, L.M., Feás, X., Seijas, J.A., Vázquez-Tato, M.P. (2012). Organic honey from Trás Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 258-264.
- Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E., Verzera, A. (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85, 305-313.
- Feás, X., Pires, J., Iglesias, A., Estevinho, M.L. (2010). Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3462-3470.
- Felsner, M.L., Cano, C.B., Bruns, R.E., Watanabe, H.M., Almeida-Muradian, L.B., Matos, J. R. (2004). Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. *Journal of food composition and analysis: an official publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 17, 737-747.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M., Estevinho, L.M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443.
- Finola, M.S., Lasagno, M.C., Marioli, J.M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, 100, 1649-1653.
- Gary, N. (2010). *Honey Bee Hobbyist, The Care and Keeping of Bees*. Bow Tie Press, Irvine, California. 178 pp.
- Gleiter, R.A., Horn, H., Isengard, H.D. (2006). Influence of type and state of vcrystallisation on the water activity of honey. *Food Chemistry*, 96, 441-445.

- Gois, G.C., Lima, C.A.B., Silva, L.T., Evangelista-Rodrigues, A. (2013). Composição do mel de *Apis Mellifera*: requisitos de qualidade. *Acta Veterinaria Brasilica*, 7, 137-147.
- Gökmen, V., Açar, Ö., Serpen, A., Morales, F. (2008). Effect of leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking. *European Food Research and Technology*, 226, 1031-1037.
- Huidobro, J.F., Santana, F.J., Sanchez, M.P., Sancho, M.T., Muniategui, S., Simal-Lozano, J. (1995). Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *Journal of Apicultural Research*, 34, 39-44.
- Inoue, K., Murayama, S., Seshimo, F., Takeba, K., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. (2005). Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 872-878.
- ISO 4833 (2003). "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C", International Standards Organization, Switzerland.
- Iurlina, M.O., Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 297-304.
- Kropf, U., Jamnik, M., Bertoneclj, J., Golob, T. (2008). Linear regression model of the ash mass fraction and electrical conductivity for Slovenian honey. *Food technology and biotechnology*, 46, 335-340.
- Küçük, M., Kolayl, S., Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltac, C., Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 526-534.
- Kujawski, M.W., Namiésnik, J. (2008). Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 9), 785-793.
- Louise, J.K., Durling, L.F.B., Björn, E.H. (2010). Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 880-884.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalinalogy. *Bee World Buck's*, 59, 139-157.
- Liu, A.A. (2009). Comparative compositional and biological properties of Muscadine and Cabernet franc grape skins. 106 p. Thesis of Master of Science – North Carolina State University.
- Maia, M., Russo-Almeida, P.A., Pereira, J.O.B. (2003). Contribuição para a caracterização do mel da região do Alvão-Marão. *O Apicultor*, 39, 19-23.
- Maia, M., Russo-Almeida, P.A., Pereira, J.O. (2005). Caracterização do Espectro Polínico dos Méis do Alentejo (Portugal). *Silva Lusitana*, 13 (1), 95-103.

- Mantilla, S.P.S., Santos, B.É., Barros., Freitas, M.Q. (2012). Análise descritiva quantitativa aplicada em mel de abelhas (*Apis mellifera*): uma revisão. *Colloquium Agrariae*, 8(2), 75-84.
- Meda, A., Lamien, C., Romito, M., Millago, J., Nacoulma, O. (2005). Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571–577.
- Mendes, C.G., Silva, J.B.A. da, Mesquita, L.X., Maracajá, P.B. (2009). As análises de mel: Revisão. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). *Revista Caatinga*, 22 (2), 07-12.
- Molan, P.C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73 (Issue 1), 5-28.
- Montenegro, S.B., Avallone, C.M., Crazov, A., Aztarbe, M. (2005). Variación del color en miel de abejas (*Apis mellifera*). *Comunicaciones Cientificas y Tecnológicas*, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, Resumen: T-070.
- Morais, L., Dias, L.A., Peres, A.M., Rocha, A.C., Estevinho, L., Machado, A.A.S.C. (2007). Aplicação de uma língua eletrônica na classificação de méis monoflorais. In: *Actas do 8º Encontro de Química de Alimentos*, Beja.
- Moreira, R.F.A, De Maria, C.A.B. (2001). Glicídios no mel. *Química Nova*, 24 (4), 516-525.
- Mundo, M.A., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 1-8.
- Nagai, T., Inoue, R., Kanamori, N., Suzuki, N., Nagashima, T. (2006). Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat, *Food Chemistry*, 97, 256–262.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Poribio, L., Jiménez, J.J., Martin, M.T. (2001). High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal Chromatography A*, 917, 95-103.
- NP-1829 (1982) - *Microbiologia Alimentar - Preparação da amostra para análise microbiológica*. Instituto Português de Qualidade (IPQ), Portugal.
- NP-4400-1 (2002) - *Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (Staphylococcus aureus e outras espécies)*. Parte 1: Técnica com confirmação de colónias (método corrente). IPQ, Portugal.
- Ojeda de Rodriguez, G., Sulbarán de Ferrer, B., Ferrer, A. e Rodriguez, B. (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, 84, 499-502.
- Olaitan, P.B., Adeleke, O.E., Ola, I.O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7, 159-165.

- PAN-Programa Apícola Nacional Triénio de 2011-2013. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Acedido em 09 de Outubro de 2012. url:http://www.gpp.pt/MA/apicultura/PAN_2011_13.pdf
- Persano Oddo, L., Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets, *Apidologie*, 35 (Suppl. 1), S38–S81.
- Perron, N.R., Brumaghim, J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53 (2), 75-100.
- Radovic, B.S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., Anklam, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72, 511-520.
- Russo-Almeida, P.A., Paiva, J. (1996). Análise polínica do mel da Terra Quente Transmontana. *O Apicultor*, 13, 33-42.
- Sancho, M.T., Muniategui, S., Sánchez, P., Huidobro, J.F., Simal, J. (1991). Mieles del Pais Vasco, XI: Evaluación de los distintos tipos de cenizas. *Anales de Bromatologia*, 4, 311-324.
- Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215S-217S.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sivakesava, S., Irudayaraj, J. (2002). Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Science & Technology*, 37, 351-360.
- Sodré, G.S., Marchini, L.C., Moreti, A.C.C.C., Otsuk, I.P., Carvalho, C.A.L. (2007). Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. *Ciência Rural*, 37 (4), 1139-1144.
- Sousa, M.E.B.C., Dias, L.G., Peres, A.M., Estevinho, L.M., Machado, A.A.S.C. (2012). Evaluation of an electronic tongue for honey classification according to its pollen analysis. In II International Symposium on Bee Products. Annual Meeting of the International Honey Commission. Bragança. ISBN 987-972-745-140-1.
- Suárez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J.F. and Simal-Lozano, J. (2002b). Solid-phase extraction procedure to remove organic acids from honey. *Journal of Chromatography B*, 770, 77-82.
- Suárez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J. (2002a). Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 955, 207–214.
- Terrab, A., Recamales, A.F., Hernanz, D., Heredia, F.J. (2004). Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, 88, 537–542.

- Vargas, T. (2006). Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos campos gerais do Paraná. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- Weston, R.J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71, 235-239.
- White, J.W. (1978). Honey. *Advances in Food Research*, 24, 287-374.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381-406.
- Yao, L., Jiang, Y., D'Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K. (2004). Quantitative High-Performance Liquid Chromatography Analyses of Flavonoids in Australian Eucalyptus Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 210-214.
- USDA Agricultural Marketing Service, United States Standards for Grades of Extracted Honey, USDA, Washington DC, May 23, 1985
- Zamora, M.C. and Chirife, J. (2006) Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina, *Food Control*, 17, 59-64.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.