

## **Estudo do Efeito da Temperatura na Qualidade do Mel**

**Sara Barbosa Lopes**

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

Orientado por

**Prof. Doutora Marieta Amélia Martins de Carvalho**

**Prof. Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho**

**Bragança  
2013**

*“Foi sempre mais fácil criticar do que fazer, mais fácil destruir do que construir. Daí existirem mais críticos do que autores, mais analistas do que obreiros, mais bocas a depreciar do que cérebros e braços a produzir.”*

**Renato Kehn**

## Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,  
Aos meus pais e irmã,  
Pelo que me ensinaram e transmitiram,  
Pelo amor e carinho,  
Pelo apoio incondicional  
Pelo que sou.

## **Agradecimentos**

Este pequeno espaço, não me permite agradecer a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a concretizar mais uma etapa da minha formação académica. Por isso, deixo apenas algumas palavras de profundo agradecimento.

À minha orientadora, Professora Doutora Marieta Amélia Martins de Carvalho pela disponibilidade, dedicação, incentivo, apoio e ajuda na orientação deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho, o meu sincero agradecimento pela co-orientação, pela disponibilidade que sempre revelou para comigo, dedicação e apoio durante todas as fases deste trabalho.

Ao Eng.º Jorge Sá Morais, pela disponibilidade, ajuda e conhecimentos transmitidos.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Microbiologia, D<sup>a</sup> Armanda, D<sup>a</sup> Fátima, Ana Paula e Ananias, pela disponibilidade e ajuda indispensáveis à realização da parte experimental deste trabalho.

À Vanessa Paulo e Georgina Tolentino, pela prontidão em ajudar, pelo apoio e boa disposição.

Aos docentes do Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, da Escola Superior Agrária de Bragança, o meu muito obrigada pelos saberes que me foram transmitidos.

Aos meus amigos, em especial, a todos que participaram nesta etapa da minha vida, que estiveram sempre a meu lado, que me ajudaram nesta fase mais complicada, em especial à Joana, Rafaela, Sandra, Andreia e Vânia pelos momentos de alegria, pelos conselhos, incentivo e apoio.

Por fim, à minha família, em especial aos meus pais e irmã, por toda a compreensão, todo o carinho, todo o apoio e ajuda que me deram sem nunca me deixarem um minuto nesta longa caminhada.

**A TODOS MUITO OBRIGADA.**

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	XI
<b>ABSTRAT</b> .....	XIII
<b>Capítulo1: <i>Introdução</i></b> .....	1
1.1. Introdução geral ao tema.....	2
1.1.1. Objetivos.....	2
1.1.2. Enquadramento teórico.....	3
1.2. Mel.....	3
1.2.1. Caracterização físico-química .....	4
1.2.1.1. Hidratos de carbono .....	5
1.2.1.2. Água .....	6
1.2.1.3. Ácidos orgânicos .....	7
1.2.1.4. Cinzas e minerais .....	8
1.2.1.5. Compostos azotados.....	9
1.2.1.6. Compostos voláteis .....	12
1.2.1.7. Compostos fenólicos .....	13
1.2.1.9. Constituintes menores e substâncias diversas .....	16
1.2.1.10. Cor .....	17
1.2.2. Análise polínica .....	19
1.2.3. Microbiota do mel .....	19
1.2.4. Métodos de conservação.....	23
1.2.5. Importância da análise sensorial do mel.....	25
1.2.5.1. Métodos de análise sensorial.....	26
1.2.5.2. Painel de provadores .....	26
1.2.5.3. Características sensoriais do mel.....	27
<b>Capítulo 2: <i>Material e métodos</i></b> .....	29

2.1.	Amostras de mel .....	30
2.2.	Análise polínica .....	30
2.3.	Caracterização físico-química do mel.....	31
2.3.1.	Humidade .....	31
2.3.2.	Condutividade elétrica.....	31
2.3.3.	Cinzas totais.....	32
2.3.4.	pH .....	32
2.3.5.	Acidez livre.....	32
2.3.6.	Açúcares redutores .....	33
2.3.7.	Sacarose aparente .....	34
2.3.8.	HMF .....	35
2.3.9.	Índice diastásico .....	35
2.3.10.	Cor .....	36
2.4.	Análises microbiológicas .....	37
2.4.1.	Preparação da amostra .....	37
2.4.2.	Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos .....	37
2.4.3.	Contagem de bolores e leveduras .....	38
2.4.4.	Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	38
2.4.5.	Pesquisa de esporos de Clostrídeos sulfito-redutores.....	39
2.4.6.	Contagem de Estafilococos coagulase positiva pela técnica de cultura com confirmação de colónias .....	39
2.4.7.	Isolamento e identificação de leveduras .....	40
2.5.	Análise sensorial .....	41
<b>Capítulo 3: Resultados e discussão .....</b>		<b>43</b>
3.1.	Análise polínica .....	44
3.2.	Caracterização físico-química.....	45
3.2.1.	Humidade .....	50

3.2.2.	pH .....	51
3.2.3.	Condutividade elétrica .....	52
3.2.4.	Cinzas .....	53
3.2.5.	Acidez livre.....	54
3.2.6.	Açúcares redutores .....	55
3.2.7.	Sacarose aparente .....	56
3.2.8.	Hidroximetilfurfural (HMF) .....	56
3.2.9.	Atividade diastásica .....	58
3.2.10.	Cor .....	59
3.3.	Caracterização microbiológica .....	60
3.4.	Identificação de leveduras .....	67
3.5.	Análise sensorial .....	67
<b>Capítulo 4:</b>	<b><i>Considerações finais</i></b> .....	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	.....	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>94</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição vitamínica do mel .....	16
<b>Tabela 2</b> - Comparação entre a cor, mm Pfund e absorvância. ....	18
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros físico-químicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico. ....	46
<b>Tabela 4</b> - Parâmetros microbiológicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico. ....	61
<b>Tabela 5</b> - Análise de variância de Procrustes. ....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura de um fenol.....	13
<b>Figura 2</b> - Estrutura química dos ácidos fenólicos mais frequentes. ....	14
<b>Figura 3</b> - Estrutura geral dos flavonóides .....	15
<b>Figura 4</b> - Estruturas das principais classes de flavonóides do mel .....	15
<b>Figura 5</b> - Refratómetro Abbe. ....	31
<b>Figura 6</b> - Condutivímetro. ....	32
<b>Figura 7</b> - Determinação da acidez livre.....	33
<b>Figura 8</b> - Galeria API 20C AUX.....	41
<b>Figura 9</b> - Prova sensorial.....	42
<b>Figura 10</b> - Caracterização polínica das amostras de mel utilizadas. ....	44
<b>Figura 11</b> - Provedores por género. ....	68
<b>Figura 12</b> - Frequência do consumo de mel. ....	68
<b>Figura 13</b> - Resíduos por objecto.....	69
<b>Figura 14</b> - Resíduos por configuração .....	69
<b>Figura 15</b> - Fatores de transformação de escala para cada configuração. ....	70
<b>Figura 16</b> - Autovalores e variabilidade acumulada por fator. ....	71
<b>Figura 17</b> - Circulo das correlações entre as dimensões e os fatores. ....	71
<b>Figura 18</b> - Coordenadas dos objectos após Análise das Componentes Principais.....	72
<b>Figura 19</b> - Coordenadas dos objectos após ACP. ....	73
<b>Figura 20</b> - Coordenadas dos objectos.....	73
<b>Figura 21</b> - Preferência de compra. ....	74

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**%** - Percentagem

**%(p/p)** – Percentagem em massa/massa

**ACP** – Análise de Componentes Principais

**ADQ** – Análise descritiva quantitativa

**APG** – Análise de Procrustes Generalizada

**a<sub>w</sub>** – Atividade de água

**cm** – Centímetros

**g** - Grama

**h** – Horas

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogénio

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Ácido sulfúrico

**HCL** – Ácido clorídrico

**HMF** – Hidroximetilfurfural

**I.D.** – Índice diastásico

**ISO** - International Organization for Standardization

**mEq.Ac/kg** – miliequivalentes de ácido por quilograma

**mEq/kg** – Miliequivalente por quilograma

**mg/kg** – Miligrama por quilograma

**mL** – Mililitros

**mm** – Milímetros

**NaOH** – Hidróxido de sódio

**NP** – Norma Portuguesa

**PANOVA** – Análise de variância de procrustes

**pH** – Potencial de hidrogénio

**rpm** – Rotação por minuto

**UFC/g** – Unidades formadoras de colónia por grama

**UV** – Ultra violeta

**µg** – Micrograma

**µm** – Micrometro

## RESUMO

O mel é um produto natural muito apreciado em todo o mundo e de elevado valor nutritivo, estando fortemente associado a um produto benéfico na promoção da saúde. No entanto, a forma inadequada de armazenamento e conservação pode ocasionar a sua deterioração, comprometendo seriamente o produto. O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da temperatura de armazenamento sobre os parâmetros físicos-químicos e microbiológicos de quatro méis monoflorais (rosmaninho, urze, cerejeira e castanheiro). Para tal, armazenaram-se as amostras durante quatro meses à temperatura ambiente (20-25°C), a 45°C e no frigorífico (4°C). A par deste estudo avaliou-se, também, o perfil polínico e sensorial dos quatro méis de produção biológica.

A origem botânica foi determinada pela análise polínica. A análise polínica indicou que todos os méis analisados, isto é o mel de rosmaninho, urze, cerejeira e castanheiro eram monoflorais, pois apresentaram como pólen dominante *Lavandula* sp. (45,83%), *Erica* sp. (49,69 %), *Prunus* sp. (61,91 %) e *Castanea* sp. (69,01%).

O efeito da temperatura de armazenamento na qualidade do mel foi avaliado utilizando os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, acidez livre, condutividade eléctrica, cinzas, açúcares redutores, sacarose aparente, HMF, índice diastásico e cor.

Relativamente à humidade, nenhuma das amostras ultrapassou o limite estabelecido pela legislação (<20%). O valor máximo obtido para o pH foi de 4,92 para o mel de urze à temperatura ambiente e o valor mínimo de 3,72 para o mel de rosmaninho na mesma condição de armazenamento. A acidez livre diminuiu em todas as amostras e em todas as condições de armazenamento. Relativamente à condutividade eléctrica e às cinzas verificou-se que para todos os méis analisados, independentemente das condições de armazenamento, os valores obtidos situaram-se, na generalidade dentro dos limites legais. Relativamente aos açúcares redutores e à sacarose verificou-se, na maioria das amostras, uma diminuição ao longo do armazenamento, no entanto, em todos os casos, os valores obtidos situaram-se dentro do estipulado por lei. Em todas as amostras analisadas verificou-se um aumento do HMF ao longo do tempo, sendo este mais acentuado a 45°C. Neste caso, os valores obtidos excederam largamente o estipulado por lei. O índice diastásico diminuiu na maioria das amostras ao longo do tempo. O armazenamento provocou um escurecimento do mel, sobretudo no de castanheiro, armazenado a 45°C.

Os parâmetros microbiológicos estudados foram: aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus*, coliformes totais, *Escherichia coli*. e os esporos de clostrídios sulfito-redutores. O nível de contaminação por aeróbios mesófilos variou entre  $<10$  e  $1,91 \times 10^2$  UFC/g para os diferentes tipos e condições de armazenamento dos méis. Os bolores e leveduras foram detectados em quantidades reduzidas, à exceção do mel de castanheiro que ultrapassou os limites estabelecidos pela Mercusol. No que se refere aos indicadores de qualidade sanitária (Coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*) e segurança (esporos de Clostrídios sulfito-redutores), apenas foram detetadas contaminações por coliformes totais, em baixos níveis, sugerindo que o produto é seguro para os consumidores. Das leveduras isoladas foi identificada apenas *Candida glabrata* spp.

A análise sensorial foi efetuada por um painel de consumidores, formado por 50 provadores, que avaliaram os parâmetros de aroma, consistência, cor e apreciação global. Os resultados obtidos na análise sensorial foram tratados pelo método Procrustes Generalizado. Constatou-se que os atributos que os consumidores conseguiram avaliar mais facilmente e cuja contribuição para a apreciação global foi mais acentuada foram a cor, o sabor e a consistência. O mel de urze apresentou valores elevados na escala de preferências no que diz respeito à apreciação global, cor, sabor e consistência e, valores intermédios quanto ao aroma. Os méis de rosmaninho, castanheiro e cerejeira foram aqueles a que os consumidores atribuíram a pontuação mais baixa. No que respeita à preferência de compra, os consumidores manifestaram maior preferência pelo mel de urze, seguido do mel de rosmaninho, castanheiro e cerejeira.

**Palavras-chave:** mel; análise polínica; análise físico-química; análise microbiológica; condições de armazenamento; análise sensorial.

## ABSTRAT

The honey is a natural product very appreciated all over the world and has high nutritional value, being strongly associated to a beneficial product in the promotion of the health. However, the inadequate form of storage and conservation can cause its deterioration, committing seriously the product. The objective of the present study was to study the effect of the storage temperature on the microbiological and physicochemical parameters of monofloral four honeys (Rosmaninho honey, Urze honey, cherry tree and chestnut tree). For such, the samples were stored during four months at room temperature and 45°C in the freezer. Alongside this study, the pollinic and sensorial profile of four (4) honeys from biological production was also evaluated.

The botanical origin was determinate by pollinic analysis. The pollinic analysis indicated that all the analyzed honeys, ie the Rosmaninho honey, Urze honey, cherry tree and chestnut tree were monoflorals, because they presented as dominant pollen *Lavandula sp.* (45.83%), *Érica sp.* (49.69%), *Prunus sp.* (61.91%) and *Castanea sp.* (69.01%).

The effect of the storage temperature in the quality of the honey was evaluated using the following physicochemical parameters: pH, free acidity, electric conductivity, ashes, reducing sugars, apparent sucrose, Hydroxymethylfurfural (HMF), diastase index and color.

Relatively to the moisture, none of the samples crossed limit established by the legislation (<20%). The maximum value obtained for the pH was 4.92 for the Urze honey stored at room temperature and the minimum value of 3.72 for the Rosmaninho honey in the same storage condition. The free acidity decreased in all the studied samples and for all the storage conditions. Relatively to the electrical conductivity and ashes, it was verified that for all the analyzed honeys, independently of the storage conditions, the obtained values located, in the generality, within the legal limits. Relatively to the reducing sugars and sucrose it was verified in most of the analyzed samples a decrease along the storage period, however, in all cases, the obtained values were within the stipulated by the legislation. In all of the analyzed samples an increase of HMF along the time was verified, being this more accentuated at 45°C. In this case, the obtained values exceeded broadly the ones stipulated by the legislation. The diastase index decreased in most of the samples along the time. The storage provoked a darkening of the honey, concretely for the chestnut tree, stored at 45°C.

The microbiological parameters studied were: Aerobics mesophiles, moulds and yeasts, *Staphylococcus aureus*, total coliforms, *Escherichia coli*. and sulphite-reducing Clostridium spores. The contamination level of aerobics mesophiles varied between <10 and  $1,91 \times 10^2$  UFC/g for the different types and storage conditions of the honeys. The moulds and yeasts were detected in reduced amounts, except for the chestnut tree honey that crossed the limits established by *Mercusol*. Regarding to the sanitary (Total coliforms, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and quality safety indicators (sulphite-reducing Clostridium spores), only were detected contaminations by total coliforms, in low levels, suggesting that the product is safe for the consumers. From the isolated yeasts only was identified *Candida glabrata* pp.

The sensorial analysis was performed by a consumer's panel, formed by 50 tasters that evaluated the aroma, consistence, color and global appreciation parameters. The obtained results in the sensorial analysis were treated by the *Generalized Procrustes* method. It was verified that the attributes that the consumers got to evaluate more easily and whose contribution for the global appreciation was more accentuated were the color, the flavor and the consistence. Regarding to the global appreciation the Urze honey presented high values in the scale of preferences respecting to color, flavor and consistence and, intermediate values for the aroma. The Rosmaninho honeys, chestnut tree and cherry tree were those that the consumers attributed the lowest punctuation. Regarding to the purchase preferences, the consumers manifested greater preference for the Urze honey, followed by the Rosmaninho honey, chestnut tree and cherry tree.

**Keywords:** honey; pollinic analysis; physicochemical analysis; microbiological analysis; storage conditions and sensorial analysis.

# Capítulo 1

*Introdução*



## **1.1. Introdução geral ao tema**

O setor apícola é uma atividade tradicionalmente ligada à agricultura. Portugal devido às condições edáfo-climáticas e à rica flora apícola, têm fortes potencialidades de crescimento neste setor. Por outro lado, a Europa é deficitária em mel não conseguindo produzir nem metade do seu consumo o que deveria ser um incentivo para o aumento da produção nacional e crescimento das exportações.

Perante isto, tem-se verificado uma crescente preocupação com a manutenção da qualidade do mel produzido em Portugal, uma vez que este produto pode sofrer várias alterações por causas diversas. Algumas destas alterações acontecem devido à falta de informação do próprio apicultor, quanto à tecnologia de extracção, à forma de manuseamento adequado, equipamentos a serem utilizados, mas principalmente à forma de armazenamento e conservação. Portanto, é extremamente importante o conhecimento das variações das características utilizadas como indicadores de qualidade, de modo a garantir um produto de qualidade no mercado cada vez mais exigente. A caracterização do mel é de grande importância, pois é um alimento natural bastante utilizado no dia-a-dia de muitas famílias, essencialmente, na alimentação de crianças e idosos, devido às suas propriedades medicinais. O conhecimento desses parâmetros durante o armazenamento e conservação do mel permite o controlo da sua qualidade.

Por outro lado, os consumidores estão cada vez mais exigentes e, por isso, torna-se necessário conhecer não apenas as características dos diferentes méis, mas também analisar a preferência do consumidor perante os diferentes produtos disponíveis no mercado português.

### **1.1.1. Objetivos**

Este trabalho tem como objetivo global estudar o efeito da temperatura de armazenamento nas características físico-químicas e microbiológicas de méis monoflorais. Será também efectuada a análise sensorial dos quatro méis monoflorais.

Desenvolver-se-á de acordo com os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação do efeito da temperatura de armazenamento na qualidade microbiológica;

- Efeito de diferentes processos de conservação nas características físico-químicas;
- Análise polínica;
- Identificação de compostos fenólicos;
- Análise sensorial.

### **1.1.2. Enquadramento teórico**

A estrutura deste trabalho encontra-se organizada em quatro capítulos. No primeiro capítulo começamos por apresentar uma introdução geral ao tema, onde se incluem os objetivos do trabalho e o enquadramento dos mesmos. Neste mesmo capítulo apresentamos uma breve revisão bibliográfica sobre o mel onde abordamos temas, tais como: a definição de mel e os seus tipos, a composição e as suas características físico-químicas e microbiológicas, a análise polínica, os métodos de conservação e, por fim, a importância da análise sensorial no mel. No segundo capítulo procedeu-se à descrição das metodologias utilizadas para a elaboração da parte experimental do trabalho. No terceiro capítulo apresentamos os resultados obtidos a par da sua discussão, recorrendo à comparação com trabalhos realizados por outros investigadores. No quarto capítulo apresentam-se as principais conclusões do estudo, tendo sempre em vista os objetivos propostos.

## **1.2. Mel**

De acordo com a legislação da União Europeia (EU, 2001), o Codex Alimentarius (Codex Stan 12-1981) e o Decreto-Lei Português 214/2003, o mel é definido como a “substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de planta, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia.”.

Os referidos diplomas estabelecem os principais tipos de mel com base na sua origem, modo de produção e ou apresentação. De acordo com a sua origem, o mel pode

ser classificado em dois tipos: o mel de néctar ou mel de flores, obtido a partir do néctar das plantas, ou em mel de melada, obtido principalmente a partir das excreções de insetos sugadores de plantas (*hemíptera*) que ficam sobre as partes vivas das plantas ou de secreções provenientes das partes vivas das plantas. Quanto ao modo de produção e ou apresentação, o mel pode ser classificado em mel de favos, mel com pedaços de favos; mel centrifugado, mel prensado e mel filtrado.

O mel pode ser ainda classificado em monofloral ou multifloral dependendo se o néctar é predominantemente originário de uma ou várias fontes florais, respectivamente.

A origem floral tem sido utilizada para a tipificação do mel como medida de valorização do produto, uma vez que está intimamente associada a aspectos organolépticos como a cor e o sabor. A flora melífera de Portugal é considerada muito rica e diversa. Maioritariamente constituída por espécies silvestres, mas também por plantas cultivadas, como o castanheiro e o eucalipto, Por isso, existe uma grande diversidade de méis monoflorais, sendo os mais representativos o mel de Rosmaninho (*Lavandula stoechas*), o mel de Urze (*Erica umbellata*) e o mel de castanheiro (*Castanea sativa*) (MADRP, 2010).

### **1.2.1. Caracterização físico-química**

A composição do mel é muito complexa, contendo cerca de 200 substâncias (Al-Mamary *et al.*, 2002; Arráez-Román *et al.*, 2006; Küçük *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009) das quais se destacam maioritariamente os hidratos de carbono (frutose, glicose, maltose e sacarose). Para além dos hidratos de carbono, apresenta pequenas quantidades de outras substâncias, tais como minerais, proteínas, vitaminas, ácidos fenólicos e flavonóides, enzimas e outras substâncias fitoquímicas (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010).

No entanto, a sua composição depende não só da origem floral que confere ao mel características específicas, mas também do clima, das condições ambientais e sazonais, assim como do manuseamento e processamento (Anklam, 1998; Al-Mamary *et al.*, 2002; Azeredo *et al.*, 2003; Arráez-Román *et al.*, 2006; Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007).

A qualidade do mel está estritamente ligada às suas características físicas, químicas e sensoriais. As propriedades físico-químicas dependem do néctar e fonte

floral, da cor, do sabor, da humidade, da quantidade de proteínas e açúcares (Azeredo *et al.*, 2003). Estas propriedades são avaliadas através de parâmetros estabelecidos na norma do Codex Alimentarius, no Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro e na Directiva 2001/110/CE do Conselho de 20 de Dezembro de 2001.

#### **1.2.1.1. Hidratos de carbono**

Os hidratos de carbono constituem os principais componentes do mel, representando cerca de 95 a 99% da matéria seca, em que os dois açúcares mais importantes são os monossacarídeos glucose e frutose que em conjunto constituem 85-90% dos açúcares totais (Olaitan *et al.*, 2007). Estes componentes contribuem de modo determinante para definir numerosas propriedades físico-químicas, nomeadamente a viscosidade, a densidade, a cristalização e o valor energético (Anklam, 1998; Alvarez-Suarez, 2010).

Por vezes, a maioria dos açúcares presentes no mel, não existem no néctar inicial, mas originam-se por ação química de enzimas produzidas pelas abelhas durante a maturação do mel na colmeia (White e Doner, 1980).

De acordo com a Legislação Portuguesa, o teor mínimo permitido para a glucose e frutose é de 60g/100g. Na maior parte dos méis, os dois açúcares não se encontram em proporções iguais, sendo o conteúdo de frutose ligeiramente superior ao da glucose, geralmente numa proporção 1,2/1 (Rodriguez *et al.*, 2004).

A proporção de glucose e frutose é de grande importância, pois condiciona o sabor e a cristalização do mel, uma vez que a glucose é pouco solúvel em água, e por consequência um conteúdo elevado deste açúcar conduz à cristalização (Anklam, 1998; Rodriguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007). Porém, essa precipitação da glucose pode provocar a fermentação do produto, devido ao aumento do teor de humidade da fase líquida que possibilita a multiplicação das células das leveduras osmofílicas presentes naturalmente no mel (Moreira e De Maria, 2001). Enquanto, uma maior concentração de frutose conserva o mel em estado líquido por mais tempo e os méis são mais doces visto que a doçura da frutose é superior à da glucose (Anklam, 1998; Rodriguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007).

Outra importante função encontrada para os monossacarídeos do mel, nomeadamente o teor de frutose, o teor de glucose e a relação F/G, é a utilização, de

modo complementar à análise polínica, na identificação de determinados tipos de méis (Moreira e De Maria, 2001).

Além dos dois monossacarídeos, o mel contém pequenas quantidades de oligossacáridos (dissacarídeos, trissacarídeos, tetrassacáridos), entre os quais se destacam a maltose e a sacarose (De Maria e Moreira, 2003).

A concentração de sacarose constitui um bom critério para diferenciar os méis monoflorais dos multiflorais (Mendes *et al.*, 2009), uma vez que a colheita prematura do mel poderá resultar em teores de sacarose acima do limite estabelecido pela legislação, no entanto determinados méis mesmo colhidos prematuramente podem não indicar teores elevados de sacarose, pois os néctares de origens florais diversas possuem diferenças na sua composição química de hidratos de carbono (Borsato, 2013).

A presença de um elevado teor de sacarose pode significar uma colheita prematura do mel, visto que a sacarose ainda não foi totalmente convertida em glucose e frutose através da ação da invertase, enzima secretada pelas abelhas (Azeredo *et al.*, 1999; Küçük *et al.*, 2007, Sodré *et al.*, 2007). Ou então pode significar uma adulteração (Sodré *et al.*, 2007).

O máximo permitido por lei é de 5g/100g, existindo exceções para alguns tipos de mel, dependendo da origem floral.

#### **1.2.1.2. Água**

Além dos açúcares, a água é o segundo componente mais importante no mel e o seu conteúdo pode ser influenciado por vários fatores como por exemplo, as condições climáticas, a época de colheita, pelo grau de maturação da colmeia mas também pelo tratamento do mel durante a extração e armazenamento. O seu conteúdo pode influenciar a viscosidade, a maturação, a cristalização, o sabor, conservação do mel (Rodríguez *et al.*, 2004; Acquarone *et al.*, 2007; Finola *et al.*, 2007; Olaitan *et al.*, 2007; Abramovič *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010) e o valor comercial (Acquarone, 2004).

O teor máximo de água presente no mel é o único critério de composição que tem de ser cumprido por todos os méis do comércio mundial (Estevinho *et al.*, 2012). Conforme o estabelecido pelo Decreto-lei nº214/2003 de 18 de agosto, o valor máximo de humidade para o mel floral puro é de 23% e não mais de 20% para o mel em geral.

Valores de humidade acima dos 20% no mel pode causar a sua fermentação devido ao desenvolvimento de certos microrganismos, alterar o odor e sabor, bem como aumentar a cristalização (Costa *et al.*, 1999; Acquarone *et al.*, 2007), dificultando a conservação e o armazenamento do mel (Olaitan *et al.*, 2007; Iglesias *et al.*, 2012). No entanto, valores muito baixos, podem aumentar a viscosidade do mel resultando numa massa excessivamente dura (Acquarone, 2004).

### 1.2.1.3. Ácidos orgânicos

A acidez do mel pode ser explicada pela presença de ácidos orgânicos, em equilíbrio com as suas lactonas correspondentes, ou ésteres internos, e alguns iões inorgânicos tais como fosfatos (Finola *et al.*, 2007). A sua presença constitui apenas 0,57 % dos compostos constituintes do mel (Olaitan *et al.*, 2007). Dos vários ácidos presentes no mel, o mais representativo é o ácido glucónico, que se forma a partir do monossacarídeo D-glucose pela ação da enzima D-glucose oxidase, com libertação de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Moreira e De Maria, 2001). Durante o armazenamento, a ação desta enzima mantém-se, porque mesmo após o processamento permanece em atividade no mel (Mendes *et al.*, 2009). Os ácidos fórmico, butírico, acético, cítrico, málico, maleico, láctico, oxálico, pirúvico, succínico, fumárico e tartárico são outros dos ácidos que podem ainda encontrar-se em menor quantidade no mel (Suárez-Luque *et al.*, 2002 a e b; Arruda, 2003). Para além de serem responsáveis pela acidez do mel, os ácidos orgânicos, contribuem para o seu sabor característico e estabilidade relativamente à deterioração microbiana (Bogdanov *et al.*, 2004).

A lei portuguesa estabelece um limite máximo para a acidez de 50 mEq/Kg de mel. Valores elevados de acidez podem ser indicativos de fermentação de açúcares em ácidos orgânicos (Pavelková *et al.*, 2013). O teor de ácido no mel é caracterizado por acidez livre e a sua medida é útil para a avaliação de fermentação de mel. Porém, também é útil para a autenticação dos méis monoflorais, e em particular para a diferenciação entre mel de néctar e de melada (Sanz *et al.*, 2005).

O mel é naturalmente ácido, pois apresenta valores de pH compreendidos entre 3,4-6,1 com uma média de 3,9 (Iurlina e Fritz, 2007). O seu valor é influenciado pela concentração de ácidos e minerais, assim como pela origem botânica (Carvalho *et al.*, 2005; Sodr e *et al.*, 2007). É de salientar, que o pH do mel não está diretamente

relacionado com a acidez livre devido à ação tampão dos ácidos e minerais, que estão naturalmente presentes (Rodríguez *et al.*, 2004). O pH é sem dúvida um índice útil para prever o crescimento de microrganismos, uma vez que o baixo pH do mel inibe a sua presença. Este parâmetro é de extrema importância durante a extração e armazenamento do mel, pois influencia a sua textura, estabilidade e vida de prateleira. (Terrab *et al.*, 2004). No entanto, o pH do mel também pode influenciar a velocidade de formação do HMF (Souza e Balzlen, 1998).

Embora o pH não seja indicado, atualmente, como análise obrigatória para avaliar a qualidade do mel, ela é utilizada de forma complementar para avaliação da acidez do mel (Silva *et al.*, 2004).

#### **1.2.1.4. Cinzas e minerais**

O teor de cinzas exprime o conteúdo de minerais presentes no mel, sendo bastante utilizado como um critério de qualidade (Bogdanov *et al.*, 1999), visto que a cinza dá uma medida direta do resíduo inorgânico após carbonização (Estevinho *et al.*, 2012). É também um parâmetro útil na determinação da origem botânica do mel, bem como na diferenciação entre mel de néctar e de melada (White, 1978; Feás *et al.*, 2010).

Geralmente, o mel apresenta um baixo teor de cinzas que depende do material recolhido pelas abelhas durante a recolha de néctar e melada (Rodríguez *et al.*, 2004). Enquanto uma ampla faixa de valores no teor de cinzas pode indicar que o processo de recolha e/ou as técnicas de apicultura utilizadas pelos apicultores não são iguais.

Através da concentração das cinzas solúveis, insolúveis, cinzas sulfatadas e a alcalinidade das cinzas (solúveis, insolúveis e totais) é possível conhecer o conteúdo mineral do mel. Sendo assim, a indicação sobre a presença de óxidos alcalino-terrosos é fornecida pelo teor em cinzas solúveis. Por sua vez, a determinação das cinzas insolúveis facultam indicações sobre a matéria siliciosa presentes nas cinzas, enquanto, a alcalinidade das cinzas reflete a presença de cátions combinados com ácidos orgânicos (Ferreira, 2008).

Os minerais estão presentes no mel em pequenas quantidades. Geralmente, os méis claros são pobres em substâncias minerais, enquanto os mais escuros, são mais ricos nessas substâncias (Aquarone, 2004), variando entre 0,04% e 0,2% respetivamente (Anklam, 1998). A maioria dos elementos minerais do mel são essenciais para o corpo

humano. O elemento principal é o potássio, que constitui um terço do total de cinzas. Estão também presentes o cálcio, enxofre, cloro, ferro, magnésio, iodo, sódio, fósforo, manganês, silício, boro, cromo, alumínio, níquel, chumbo, estanho, zinco e cádmio (Aquarone, 2004).

Para além da importância nutricional dos minerais e o fato de que eles afetam a cor (Vorlova e Celechovska, 2002), o conteúdo mineral é também um importante indicador de uma possível poluição ambiental ou da origem geográfica de mel (Anklam, 1998).

A legislação estabelece que os sais minerais como teor de cinza, devem apresentar um teor máximo de 0,6% para o mel de néctar e de 1% para o mel de melada.

#### **1.2.1.5. Compostos azotados**

No mel, as substâncias azotadas são representadas por aminoácidos livres e por proteínas de diversas origens, estando presentes em quantidades relativamente baixas (Bogdanov, 2009). Apesar dos efeitos nutritivos serem reduzidos, estes componentes podem ser importantes para a avaliação da qualidade (Bogdanov, 2009).

A maioria dos aminoácidos são fisiologicamente importantes (Perez *et al.*, 1989; Cotte *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2007) e estão presentes no mel em pequena quantidade, aproximadamente 1%.

O aminoácido livre presente em maior quantidade é a prolina, representando mais de 50% do total de aminoácidos livres. Este aminoácido é adicionado ao mel pelas abelhas aquando do início da conversão do néctar em mel e é uma medida de maturação do mel. Em méis normais, o conteúdo de prolina deve ser superior a 200 mg/kg. Porém, valores inferiores a 180 mg/kg, significa que o mel é provavelmente adulterado (Bogdanov, 2009).

Para além da prolina existem mais 26 aminoácidos. O perfil de aminoácidos de um mel pode ser característico da sua origem botânica, uma vez que a principal fonte de aminoácidos é o pólen.

Os principais aminoácidos identificados no mel de diferente origem botânica e geográfica são: ácido glutâmico (Glu), ácido aspártico (Asp), asparagina + serina (Asn + Ser), glutamina (Gln), histidina (His), glicina (Gli), treonina (Thr), b-alanina (b-Ala), arginina (Arg), a-alanina (a-Ala), ácido g-aminobutírico (GABA), prolina (Pro), tirosina

(Tyr), valina (Val), um íão amónio ( $\text{NH}_4^+$ ), metionina (Met), cisteína (Cis), isoleucina (Ile), leucina (Leu), triptofano (Trp), fenilalanina (Phe), ornitina (Orn), lisina (Lys) (Hermosín *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2004; González-Paramás *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2007).

O mel contém aproximadamente 0,5% de proteínas, provenientes de duas origens, a vegetal, procedente do néctar e do pólen da planta, e a animal, oriunda dos constituintes das secreções das glândulas salivares das abelhas, bem como dois produtos recolhidos durante a colheita do néctar ou maturação do mel. Em diferentes méis já foram encontradas 11 proteínas mas apenas 4 são comuns a todos. Este fato pode estar relacionado com a origem da abelha e não com o néctar (White e Doner, 1980). No entanto, ainda pouco se conhece sobre as proteínas do mel, apenas se sabe que uma classe particular de substâncias proteicas é representada pelas enzimas (White e Doner, 1980).

As enzimas são substâncias de natureza proteica que cumprem a importante função de catalisadores biológicos. Isso significa que são capazes de determinar e acelerar a maior parte das reações que originam a formação do mel a partir do néctar e da melada. Também são responsáveis por transformações nas características físico-químicas e nutricionais em alguns méis (Melo *et al.*, 2003).

O mel contém diversas enzimas que derivam das glândulas hipofaríngeas das abelhas, pólen, néctar, ou até mesmo dos microrganismos do mel. As mais importantes são adicionadas pela abelha durante a conversão do néctar em mel (White e Doner, 1980).

A atividade enzimática é indicativo da exposição do mel ao calor durante o processamento e armazenamento. No entanto, a atividade enzimática é muito variável entre amostras devido à adição de diferentes quantidades de saliva no mel pelas abelhas, consoante as condições climáticas (Anklam, 1998). Assim sendo, a quantidade de enzimas presente no mel pode constituir um índice de frescura do produto, uma vez que se degradam de maneira progressiva com o tempo ou como consequência de tratamentos térmicos.

As principais enzimas do mel do mel são: a sacarase (invertase) e a glucose oxidase, segregadas pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas, ao passo que as amilase (diástase) em parte são de origem animal e em parte vegetal. Outras enzimas presentes

no mel, catálase e fosfatase ácida, têm origem na planta, isto é, derivam do néctar e da melada (Pereira, 2007).

A invertase atua sobre  $\frac{3}{4}$  da sacarose do néctar hidrolisando-a em glucose e frutose, que são os principais açúcares do mel (Melo *et al.*, 2003). A inversão da sacarose do néctar por esta enzima dá-se até ao amadurecimento do mel. Excepto quando é inativa pelo aquecimento, a enzima invertase permanece no mel retendo a sua atividade por mais algum tempo (White e Doner 1980; Camargo *et al.*, 2006). Mesmo assim, o teor de sacarose do mel nunca chega a zero. Por isso, quanto mais velho for o mel, menos sacarose conterá (Melo *et al.*, 2003).

A glucose-oxidase, na presença de água e oxigénio, é a responsável pela conversão da glucose em ácido glucónico (principal composto ácido do mel) e peróxido de hidrogénio (água oxigenada), sendo capazes de preservar e manter a esterilidade do mel durante a maturação, pois são considerados fortes agentes antioxidantes que atacam o envoltório dos microrganismos (Silva *et al.*, 2006). A ação desta enzima mantém-se mesmo durante o armazenamento, pois permanece em atividade no mel mesmo após o processamento (Mendes *et al.*, 2009).

A amílase (diástase) tem a função de digerir a molécula de amido, podendo também estar envolvida na digestão do pólen (Camargo *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2009; Tho *et al.* 2011). A determinação desta enzima é geralmente utilizada para avaliar o estado de frescura do mel (Rodríguez *et al.*, 2004; Küçük *et al.*, 2007) e eventual superaquecimento que o mel possa ter sofrido, por esta enzima ser termolábil, isto é, instável quando exposta a elevadas temperaturas. Esta enzima também fornece indicações sobre a vida de prateleira do mel, uma vez que o mel quando armazenado por um período prolongado à temperatura ambiente a amílase deteriora-se (Melo *et al.*, 2003). A ausência da mesma reflete procedimentos e/ou adulterações realizadas no mel, tal como uso de temperatura acima de 60°C durante o beneficiamento, adição de açúcar invertido, condições de armazenamento inadequadas (tempo acima de seis meses e temperaturas elevadas) (Aroucha *et al.*, 2008). Os regulamentos internacionais definem um valor mínimo de 8 na escala de Gothe para o índice diastásico, e de 3 na escala de Gothe para méis com baixo teor de enzimas naturais (Codex Alimentarius, 2001; EU, 2002).

A catalase provém do pólen e tem a função de destruir o peróxido de hidrogénio. A concentração de catalase no mel permite determinar efetivamente a quantidade de

peróxido presente no mel que dependerá da fonte floral, da quantidade de pólen recolhidos pelas abelhas, assim como da sua atividade (Weston, 2000).

A fosfatase ácida é uma hidrolase que gera fosfatos inorgânicos a partir de fosfatos orgânicos. Embora também se apresente como componente do néctar, esta enzima está presente principalmente no pólen. Contrariamente às enzimas mencionadas anteriormente, a fosfatase ácida apresenta atividade enzimática mais baixa e menor resistência ao calor e armazenamento. Por isso, é interessante a determinação da atividade da fosfatase, uma vez que os seus valores podem estar relacionados com a deterioração do mel por fermentação (Alonso-Torre *et al.*, 2006). Futuramente a fosfatase ácida poderá ser utilizada para avaliar fermentações, pois este autor verificou que há um aumento da atividade desta enzima particularmente durante o crescimento exponencial das leveduras fermentativas.

#### **1.2.1.6. Compostos voláteis**

Os compostos voláteis contribuem para definir o aroma e sabor característico de um mel (Bastos *et al.*, 2002; Escriche *et al.*, 2009). Até ao momento já foram identificados cerca de 600 compostos voláteis em diferentes tipos de méis (Bogdanov, 2009), incluindo ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, terpenos e ésteres (Castro-Vázquez *et al.*, 2009).

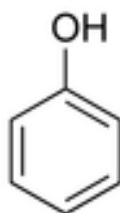
A maioria destes compostos provêm das plantas, do néctar das flores, mas alguns deles podem ser adicionados por abelhas (Bogdanov, 2009).

Alguns aldeídos e álcoois ramificados podem ser formados por metabolismo microbiano, enquanto os derivados de furano surgem através de reações de Maillard ou desidratação de açúcares em meio ácido. Estas reações podem ser aceleradas se o mel for submetido a temperaturas elevadas durante o processamento ou armazenamento. Por isso, vários autores consideram que a presença destes compostos no mel são bons indicadores da qualidade microbiana, assim como do tratamento térmico e condições de armazenamento do mel (Anklam, 1998; Bastos *et al.*, 2002; Escriche *et al.*, 2009).

A presença destes compostos pode fornecer informações acerca da origem botânica do mel, e se foi produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores ou de exsudados secretados pelas plantas ou insetos (Escriche *et al.*, 2009).

### 1.2.1.7. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários derivados das plantas (Bogdanov *et al.*, 2004; Ferreira, 2008). Quanto à sua estrutura química, caracterizam-se por possuir pelo menos um anel aromático, contendo um ou mais grupos hidroxilo, ou seus derivados funcionais, representado na figura 1. Existem aproximadamente 8.000 compostos fenólicos diferentes, que de acordo com a sua respectiva estrutura química podem ser divididos em classes: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos (Balasundram *et al.*, 2006).



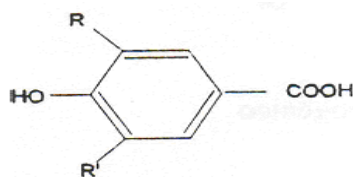
**Figura 1** - Estrutura de um fenol.

O mel contém um grande número de compostos fenólicos, que são geralmente reconhecidos como de grande importância devido ao seu efeito quimiopreventivo em seres humanos (Arráez-Román *et al.*, 2006), visto que muitos deles têm propriedades captadoras de radicais livres, o que confere a atividade antioxidante (Oliveira *et al.*, 2012). Além disso, também apresentam atividade anticancerígena, anti-inflamatória, anti-trombótico, antiteratogénica, modelador imunitário e analgésico, antiviral, antibacteriana, entre outros (Estevinho *et al.*, 2008).

A classe de compostos fenólicos mais importantes no mel são os flavonóides e os ácidos fenólicos, que são considerados potenciais marcadores da origem botânica do mel (Estevinho *et al.*, 2008; Alvarez-Suarez *et al.*, 2012a).

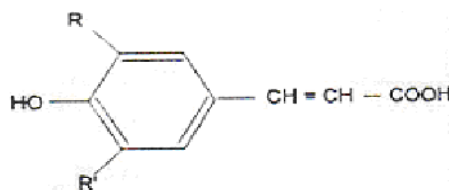
Os ácidos fenólicos dividem-se em duas subclasses: os ácidos benzóicos substituídos e os ácidos cinâmicos (Estevinho *et al.*, 2008). As suas estruturas gerais e alguns exemplos de cada grupo estão representadas na figura 2.

### Derivados dos ácido benzóico



- R=R'=H; Ácido *p*-hidroxibenzóico
- R=OH, R'=H; Ácido protocatéuico
- R=OCH<sub>3</sub>, R'=H; Ácido vanílico
- R=R'=OH; Ácido gálico
- R=R'=OCH<sub>3</sub>; Ácido siríngico

### Derivados do ácido cinâmico



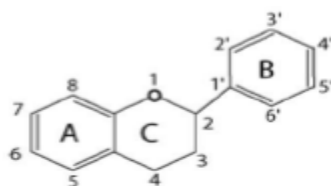
- R=R'=H; Ácido *p*-cumárico
- R=OH, R'=H; Ácido cafeíco
- R=OCH<sub>3</sub>, R'=H; Ácido ferúlico
- R=R'=OCH<sub>3</sub>; Ácido sináptico

**Figura 2** - Estrutura química dos ácidos fenólicos mais frequentes (Ferreira, 2008).

Segundo vários autores, os ácidos gálico e *p*-cumárico foram identificados como dominantes no mel, por sua vez os ácidos cafeico, ferúlico, elágico, clorogénico, siríngico, vanílico, cinâmico e *p*-hidroxibenzóico foram identificados como constituintes minoritários (Andrade *et al.*, 1997a; Aljadi e Yusoff, 2003; Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Bertoncej *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2008).

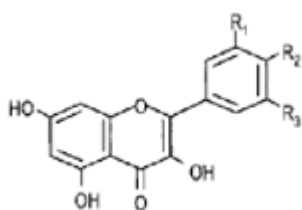
Os flavonóides caracterizam-se pela presença de dois anéis aromáticos benzénicos ligados por uma cadeia com três átomos de carbono (que podem ou não formar um terceiro anel) com a estrutura geral C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. A estrutura geral dos flavonóides está representada na figura 3 com os anéis designados por A, B e C, de modo a facilitar a análise, e o sistema de numeração (Ferreira, 2008; Barbosa, 2011).

Os flavonóides presentes no mel são divididos em três classes com estrutura semelhante: flavonóis, flavonas e flavononas (figura 4) (Estevinho *et al.*, 2008). Os principais flavonóides presentes no mel são miricetina, tricetina, quercetina, hesperatina, luteolina, caempferol, pinocembrina, crisina, pinobanksina, genkvanina e galangina (Anklam, 1998; Yao *et al.*, 2004; Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Bertoncej *et al.*, 2007).



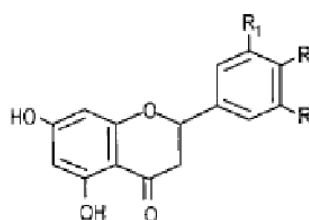
**Figura 3** - Estrutura geral dos flavonóides (Paula, 2012).

### Flavonóis



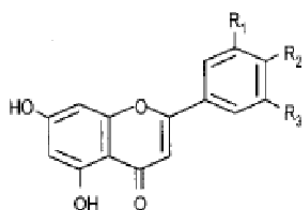
R<sub>2</sub>=OH; R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>; **campferol**  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH; **quercitina**  
 R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH; **miricitina**

### Flavanonas



R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=OH; **narigenina**

### Flavonas



R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OH; **luteonina**

**Figura 4** - Estruturas das principais classes de flavonóides do mel (Paula, 2012).

#### 1.2.1.8. Vitaminas

As vitaminas estão presentes no mel em quantidades extremamente baixas. Embora, em quantidades muito reduzidas é possível encontrar vitaminas do complexo

B, tais como B<sub>1</sub> (tiamina), B<sub>2</sub> (riboflavina), B<sub>6</sub> (piridoxina), niacina, ácido pantoténico, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina K (filocinona), vitamina D e E (Tab. 2). Estas podem ser facilmente assimiladas pela associação a outras substâncias como os hidratos de carbono, sais minerais, oligoelementos ou ácidos orgânicos. A sua origem é atribuída fundamentalmente aos grânulos de pólen que se encontram no mel. No entanto, quando submetido a um processo de filtração, o mel, pode ver o seu conteúdo em vitaminas diminuído devido à retirada de parte do pólen (Pereira, 2007; Bogdanov *et al.*, 2008).

**Tabela 1** - Composição vitamínica do mel

<b>Vitaminas (mg/100g)</b>	
Filocinona (Vitamina K)	0.025
Tiamina (Vitamina B <sub>1</sub> )	0.00-0.01
Riboflavina (Vitamina B <sub>2</sub> )	0.01-0.02
Piridoxina (Vitamina B <sub>6</sub> )	0.01-0.32
Niacina	0.10-0.20
Ácido Pantoténico	0.02-0.11
Ácido Ascórbico (Vitamina C)	2.2-2.5

**Fonte:** Adaptado de Bogdanov *et al.*, 2008

#### **1.2.1.9. Constituintes menores e substâncias diversas**

Por constituintes menores entende-se aqueles componentes, quimicamente muito diversos entre si, que em quantidades extremamente reduzidas encontram-se em todos os méis ou apenas nalguns deles.

Entre os constituintes menores do mel, talvez o mais discutido seja o hidroximetilfurfural (HMF). Este composto é um aldeído cíclico formado por degradação dos açúcares, em particular da glucose e frutose, em meio ácido (Nozal *et al.*, 2001). Ou pode ser formado por reação de Maillard (Nozal *et al.*, 2001; Tosi *et al.*, 2002; Küçük *et al.*, 2007). No mel recém extraído, o hidroximetilfurfural encontra-se praticamente ausente. Porém, a sua concentração tende a aumentar de forma gradual em todos os méis durante o armazenamento prolongado e tratamento térmico (Bastos *et al.* 2002; Zappalà *et al.* 2005; Spano *et al.* 2006; Finola *et al.*, 2007; Tho *et al.*, 2011;

Khalil *et al.*, 2012). A presença de elevados níveis de HMF podem indicar alterações provocadas por armazenamento prolongado em condições inadequadas, superaquecimento ou adulterações provocadas por adição de açúcar invertido (Nozal *et al.*, 2001; Marchini *et al.*, 2005). O hidroximetilfurfural é um dos principais produtos de degradação no mel sendo o aumento de sua concentração influenciada pelo baixo pH, acidez total, minerais, origem botânica, humidade, temperatura e stress fotoquímico (Spano *et al.*, 2006). Neste sentido, pode-se considerar um componente do mel, cuja presença é utilizada como um índice do estado de frescura e de conservação. O Codex Alimentarius estabelece um nível máximo de HMF de 40 mg/Kg.

São considerados também componentes do mel os sólidos insolúveis. Os sólidos insolúveis referem-se às impurezas insolúveis em água presentes no mel, nomeadamente os grãos de pólen, as partículas de cera, fragmentos de insetos e de plantas. Estas impurezas não podem exceder o máximo permitido pela legislação, de 0,1g/100g de mel. Valores superiores aos determinados pela legislação estão, normalmente, relacionados com falhas durante o processo de filtração ou decantação do mel (Sousa, 2011).

Outros componentes do mel, ainda pouco conhecidos, são os pigmentos que participam na definição da cor. Os pigmentos do mel pertencem às classes dos carotenóides, antocianinas e flavonas. Os níveis de carotenóides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) em algumas variedades de mel variam de 1,49 a 183,07 (Silva *et al.*, 2006).

#### **1.2.1.10. Cor**

A cor do mel depende essencialmente da sua origem floral, podendo variar do branco água a âmbar escuro, mas também pode estar correlacionado com o armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura na qual o mel amadurece na colmeia (Arnaud *et al.*, 2008; Mantilla *et al.*, 2012). Alguns componentes do mel, como por exemplo, a proporção de frutose/glicose, o conteúdo de azoto e aminoácidos livres, as substâncias polifenólicas, o conteúdo de minerais, bem como a instabilidade da frutose em solução ácida, também são determinantes para o escurecimento deste produto (Sodré, 2005).

Durante o armazenamento pode ocorrer o escurecimento do mel devido a Reações de Maillard, caramelização da frutose e reações de polifenóis. O grau de

escurecimento vai depender da temperatura e/ou tempo de armazenamento (Bertoncelj *et al.*, 2007).

Esta é uma das características sensoriais do mel e a que mais influência a escolha do consumidor, tornando-se um parâmetro importante na determinação da sua qualidade (Anupama *et al.*, 2003; Arnaud *et al.*, 2008). Além disso, é um dos fatores que determinam o seu preço no mercado mundial (Arnaud *et al.*, 2008).

Geralmente, os méis claros são os mais aceites pelo consumidor na maior parte das regiões em Portugal, uma vez que apresentam um aroma suave e, por isso, possuem um valor comercial mais elevado quando comparado com os méis escuros (Arnaud *et al.*, 2008). Méis de cor escura não significam que são de qualidade inferior. Pelo contrário, o mel escuro é rico em minerais (fosfato de cálcio e ferro), e, portanto mais adequado às necessidades dos organismos em desenvolvimento, dos indivíduos anémicos e intelectuais submetidos a esforços mentais (Montenegro *et al.*, 2005).

A determinação da cor é uma ferramenta útil na classificação de méis (Anupama *et al.*, 2003), sendo uma das características que permite identificar a sua origem floral (Bertoncelj *et al.*, 2007). A cor é expressa em mm e compreende branco-água, extra-branco, branco, âmbar extra-claro, âmbar claro e âmbar escuro, conforme o padrão comercial de classificação, na escala de Pfund.

**Tabela 2** – Comparação entre a cor, mm Pfund e absorvância.

Cor do mel	Mm Pfund	Absorvância
Branco Água	0-8	0.104-0.125
Extra Branco	8-16.5	0.125-0.148
Branco	16.5-34	0.148-0.195
Âmbar Extra	34-50	0.195-0.238
Âmbar Claro	50-85	0.238-0.333
Âmbar	85-114	0.333-0.411
Escuro	Mais de 114	0.411 ou mais

**Fonte:** Adapado de Montenegro *et al.*, 2008

### 1.2.2. Análise polínica

A identificação das plantas visitadas pelas abelhas é de extrema importância para os apicultores, uma vez que indica as fontes de alimento utilizadas para recolha de néctar e pólen visando maximizar o uso dos recursos tróficos, sobretudo em áreas de vegetação natural (Alves *et al.*, 2006).

As análises polínicas do mel, isto é, a Melissopalínologia, é uma metodologia de grande importância no controlo de qualidade alimentar do mel e no processo de emissão de certificados de origem botânica e geográfica pois, além de permitirem definir a sua origem geográfica e botânica também permitem detetar adulterações (Pires *et al.*, 2000; Morais *et al.*, 2007).

O levantamento polínico qualitativo e quantitativo de uma amostra de mel, obtido pela análise polínica, constitui o seu espectro polínico (Downey *et al.*, 2005). Através do conhecimento do espectro polínico é possível fazer a identificação botânica e geográfica do mel, por meio da contagem de grãos de pólen contidos no mel diluído em água. Em que, pólen dominante (>45%) representa a origem botânica do mel, o acessório (>15 a 45%) indica outras plantas visitadas, enquanto o isolado (<15%) fornece a origem geográfica da amostra (Escuredo *et al.*, 2012).

A designação de monofloral geralmente é utilizada para descrever méis obtidos a partir de uma única espécie de planta. Se a frequência de pólen de uma espécie de planta é maior do que 45 %, então o mel é considerado monofloral (Estevinho *et al.*, 2012). No entanto, esta percentagem não é válida para amostras de mel com grãos de pólen sub-representados, (isto é, *Thymus*, *Rosmarinus*, *Citrus* e *Arbutus*), que necessita no mínimo de 10-20% de grãos de pólen para ser considerado monofloral. Por outro lado, existem tipos de mel com grãos de pólen sobre-representados, (isto é, *Castanea*, *Cynoglossum* e *Myosotis*), que requerem um mínimo de 70 a 90% de grãos de pólen para ser considerado monofloral (Estevinho *et al.*, 2012).

### 1.2.3. Microbiota do mel

A avaliação da qualidade microbiológica de um produto fornece inúmeras informações que permitem avaliá-lo quanto às condições de processamento,

armazenamento e distribuição para consumo, vida útil, bem como o seu potencial risco para a saúde pública (Franco, 2008).

O mel é geralmente considerado um alimento microbiologicamente seguro (Vargas, 2006). As suas propriedades intrínsecas, nomeadamente o pH baixo, humidade e atividade da água ( $a_w$ ) baixa, viscosidade elevada, concentração elevada de açúcares e pressão osmótica alta, previnem o desenvolvimento microbiano, uma vez que, afectam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos por ação bacteriostática ou bactericida (Iurlina e Fritz, 2005). No entanto, o mel não é um alimento estéril e está vulnerável a contaminações microbianas, mas quando comparado com outros produtos de origem animal apresenta uma reduzida flora microbiana (Mendes *et al.*, 2009). Estas contaminações podem ocorrer através de fontes primárias, como o pólen, trato digestivo da abelha, poeira, ar, sujidade e flores, sendo muito difíceis de controlar (Snowdon e Cliver, 1995; Finola *et al.*, 2007; Olaitan *et al.*, 2007). Ou então, através de fontes secundárias, nomeadamente os manipuladores (infecções cutâneas e contaminação fecal); a contaminação cruzada (dos animais ou de produtos animais) e o equipamento (a partir de resíduos de alimentos ou água). No entanto, estas fontes de contaminação podem ser mais fáceis de controlar através da implementação de Boas Práticas de Fabrico (Snowdon e Cliver, 1995; Finola *et al.*, 2007).

Fungos, leveduras e bactérias formadoras de esporos são os principais microrganismos que poderão estar presentes no mel, uma vez que suportam concentrações elevadas de açúcar, acidez e as propriedades antimicrobianas do mel (Snowdon e Cliver, 1996). Estes grupos de microrganismos podem estar diretamente relacionados com a deterioração do produto, produção de enzimas, toxinas, conversão metabólica do alimento, produção de fatores de crescimento, nomeadamente vitaminas e aminoácidos, e fatores de inibição de microrganismos competidores (Silva *et al.*, 2008).

Os bolores habitualmente encontrados no mel pertencem ao género *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus*. Estas espécies são potencialmente patogénicas, uma vez que produzem metabolitos tóxicos. Por isso, a contaminação do mel por toxinas (micotoxinas) produzidas por estes fungos representam um perigo quando ingeridos. Entre as micotoxinas, o grupo das aflatoxinas constituem uma ameaça para a saúde humana. Além da perda económica devido à contaminação de alimentos, as aflatoxinas são toxigénicas, carcinogénicas, mutagénicas e teratogénicas (Martins *et al.*, 2003). Estudo realizado por Martins *et al.* (2003), utilizando 80 amostras de mel colhidas

aleatoriamente a partir do comércio não especializado da cidade de Lisboa identificou estes três géneros de bolores.

Normalmente, os fungos estão associados ao conteúdo intestinal das abelhas, à colmeia e ao ambiente onde as abelhas colhem o néctar, por isso contagens elevadas destes microrganismos, particularmente da estirpe de *Bettsya alvei* spp, *Acosphaera* spp e *Acosphaera major* spp, podem ser indicativos de contaminação fecal recente, originária do ambiente que rodeia o local onde as abelhas colhem o néctar, da colmeia ou do equipamento de processamento do mel (Snowdon e Cliver, 1996; Finola *et al.*, 2007).

O pH baixo e elevadas concentrações de açúcares favorecem o crescimento de leveduras no mel. A presença de leveduras osmófilas, isto é, tolerante ao açúcar, constituem um problema, pois são responsáveis pela fermentação em méis granulados, com elevados teores de humidade (superior a 21%), de cinzas e compostos azotados, tornando o produto impróprio para consumo. Porém, o crescimento deste tipo de microrganismos é limitado pela quantidade de água disponível, pois quanto maior a quantidade de água disponível no mel, maior será a concentração de leveduras e consequentemente maior será a fermentação (Snowdon e Cliver, 1996). Também é possível encontrar leveduras pertencentes à própria flora do mel, as quais são introduzidas na colmeia pelas abelhas através do néctar, pólen ou melada, ou pelas próprias abelhas durante as operações de limpeza, ao veicular estes microrganismos sobre ou dentro de seus organismos (Mendes *et al.*, 2009). As leveduras osmófilas que predominam no mel são, principalmente do género *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torula* (Migdal *et al.*, 2000). No entanto, outros géneros de leveduras também já foram referidas, como por exemplo *Debaromyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Trichosporum*, *Nematospora*, *Zygasaccharomyces* (Snowdon e Cliver, 1996). Num estudo realizado por Martins *et al.* (2003) as espécies de leveduras identificadas foram detectadas com uma frequência elevada e altos níveis de contaminação, 75% das amostras continham *Candida humicola* e 88,8% das amostras continham *Saccharomyces* num teor de  $10^3$  e  $10^4$  UFC/g, concluindo que estas espécies de leveduras são possivelmente bons indicadores de qualidade microbiológica. Estudos relativos à quantificação de leveduras no mel são escassos, no entanto Rall *et al.* (2003) verificaram uma incidência de 64% de bolores e leveduras em méis obtidos no estado de São Paulo no Brasil. Finola *et al.* (2007)

verificaram que a contagem destes microrganismos em méis da Argentina central era inferior a 10 UFC/g.

As bactérias podem sobreviver no mel mas não crescem, ao contrário dos seus esporos que podem persistir indeterminadamente (López e Alippi, 2007). Contudo, ainda não foram encontrados no mel formas vegetativas de bactérias, isto é, não formadores de esporos (Snowdon e Cliver, 1996; Iurlina e Fritz, 2005). No entanto, se introduzidas no mel podem sobreviver por longos períodos, principalmente a baixas temperaturas (Snowdon e Cliver, 1996). Como as bactérias não se replicam, uma elevada contagem de células vegetativas é indicativo de uma contaminação recente por uma fonte secundária (Iurlina e Fritz, 2005).

No mel, a quantidade de bactérias presentes pode variar em função do tipo de mel (néctar ou melada), idade, momento de colheita e da técnica de análise utilizada (Snowdon e Cliver, 1996).

Habitualmente, os esporos de bactérias mais comuns no mel pertencem aos géneros *Bacillus* e *Clostridium* (Finola *et al.*, 2007). As espécies mais frequentes de *Bacillus* são: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, e *B. coagulans* (López e Alippi, 2009). Os esporos de *Clostridium* sulfito-redutores no mel são indicadores de contaminação ou poluição, mas normalmente estão presentes em baixos níveis (Finola *et al.*, 2007). Desde que, em 1976, o botulismo infantil foi identificado, nos EUA, que a pesquisa do grupo de bactérias esporuladas presentes no mel reveste-se de importância (Ragazani *et al.*, 2008). O consumo de mel contendo esporos de *C. botulinum* é especialmente perigoso para bebés e crianças, pois na ausência de uma flora intestinal competitiva e sendo o pH do seu intestino elevado, os esporos podem germinar no intestino, e formar a toxina *in situ*, provocando o botulismo infantil. Por este motivo, apesar da baixa incidência destes microrganismos no mel, as autoridades recomendam que este produto não seja utilizado na alimentação de crianças com menos de um ano de idade. Estas bactérias podem ser também problemáticas em indivíduos imunodeprimidos, e quando o mel é aplicado terapêuticamente em feridas (Estevinho, 2011). A presença desta bactéria tem sido referida por alguns autores. Finola *et al.* (2007) detetaram a presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores em 70% das amostras de mel analisadas, enquanto as amostras analisadas por Iurlina e Fritz (2005) não revelaram a presença destes microrganismos.

#### 1.2.4. Métodos de conservação

A conservação de alimentos tem por objetivo oferecer ao consumidor, alimentos e produtos alimentícios, não só com qualidades nutritivas e organolépticas, mas principalmente produtos isentos de microrganismos e suas toxinas, nocivos à saúde.

O mel é um produto natural que tem a vantagem de se auto-conservar, por causa do ácido fórmico, um excelente conservante natural, sem ter a necessidade do uso de conservantes.

A conservação dos méis é muito importante, uma vez que armazenamento em locais inadequados e, principalmente, a temperaturas elevadas, é um fator limitante para a deterioração rápida, comprometendo a qualidade do mel. É, portanto, de fundamental importância armazenar o mel sob condições adequadas (Melo, 2002).

Foram sugeridos procedimentos para aumentar o tempo de conservação do mel, reduzindo a cristalização e fermentação e o desenvolvimento de fungos. Estes procedimentos, no entanto, aumentam os teores de HMF e reduzem a atividade diastásica, ou seja, comprometem a qualidade do mel (Tosi *et al*, 2004).

O tratamento térmico é um dos métodos empregue na conservação do mel. O seu principal objetivo é reduzir o teor de humidade e destruir a carga microbiana.

Souza e Silveira (1987) afirmaram que o calor é utilizado frequentemente na descristalização do mel, e também como tratamento preventivo de sua cristalização e fermentação. Contudo, informam que os danos advindos do aquecimento tornam-se menores quando cuidados são tomados na duração e quantidade de calor utilizado no tratamento do mel (Moura, 2006).

Embora, o tratamento térmico possa efetivamente reduzir a humidade, reduzir, retardar a cristalização e destruir completamente as células de leveduras, as altas temperaturas são prejudiciais à qualidade do produto final, uma vez que o efeito causado ao mel é cumulativo e irreversível.

O tratamento térmico do mel também pode levar a alterações na cor do mesmo. A condensação de açúcares com aminoácidos livres leva a formação de uma variedade de pigmentos “marron” (Turkmen *et al*, 2006).

Tosi *et al*. (2002) mostraram que o uso do tratamento térmico para eliminação da cristalização ou pasteurização pode aumentar o conteúdo de HMF.

A conservação pelo frio tem a vantagem de preservar grande parte do valor nutritivo e organoléptico. Porém tem a desvantagem de não eliminar os microrganismos presentes, nem a ação nociva das suas toxinas, apenas os inactiva, daí que quando encontram condições ambientais favoráveis retomam a sua atividade. Assim, é importante garantir a boa qualidade da matéria-prima antes da refrigeração, para além do controlo cuidadoso da temperatura no decorrer destes processos (Costa, 2010).

A refrigeração faz parte dos métodos habitualmente empregues pela indústria alimentar para a conservação dos produtos. As baixas temperaturas retardam as reações químicas, bem como a atividade das enzimas e dos microrganismos dos alimentos. (Baptista e Linhares, 2005).

A conservação a baixas temperaturas tem sido a alternativa mais comum, citada na literatura, para desacelerar a perda de qualidade dos méis. No entanto, é importante que se conheça o comportamento de cada mel, quando submetido a estas condições, pois a perda de qualidade é retardada, mas o processo de cristalização pode ser acelerado, havendo, neste caso, a necessidade de descristalização com tratamento térmico (Moura, 2006)

Crane (1975) já afirmava que méis conservados refrigerados apresentam granulação mais rápida.

A conservação do mel a 0°C é muito cara na maior parte das áreas produtoras de mel, mas cinco semanas a 0°C podem prevenir uma granulação subsequente. Qualquer temperatura abaixo de 10°C retarda grandemente a granulação, e qualquer temperatura até 11°C também desencoraja a fermentação. De 11 a 21°C é a faixa mais provável de induzir fermentação, e de 10 a 18°C a faixa mais favorável à granulação, especialmente 14°C. Temperaturas de 21 a 27°C são menos prováveis de induzir tanto à fermentação como à granulação, mas enzimas são destruídas e o HMF é produzido rapidamente, tornando-se o mel mais escuro. Acima de 27°C não há fermentação, mas o dano é ainda mais rápido. Em média, o mel deve ser armazenado a temperaturas o mais baixa possível, a 11°C ou menos (Crane, 1983).

A embalagem de produtos alimentares deve prolongar a vida-útil dos produtos, isto é, manter as características físicas, químicas, microbiológicas e organolépticas dos produtos pelo período de tempo requerido, evitando ou minimizando as perdas. Para o mel, devem-se utilizar apenas embalagens próprias para o acondicionamento de produtos alimentícios e preferencialmente novas, pois não se recomenda a reciclagem

de embalagens de outros produtos alimentares (margarina, óleo, etc.). Atualmente, no mercado, existem embalagens específicas para mel, com várias capacidades e formatos (Pereira, 2003).

### **1.2.5. Importância da análise sensorial do mel**

O mel é um produto mundialmente conhecido, sendo muito apreciado devido ao seu sabor e aroma, mas também pela sua qualidade nutricional. Entre as técnicas existentes para avaliar essa qualidade, a análise sensorial de mel tem demonstrado ser uma importante ferramenta de qualidade (Ferreira *et al.*, 2009).

Esta técnica permite determinar a aceitabilidade de um produto comercial e promover o desenvolvimento de novos produtos que tenham em conta as preferências individuais dos consumidores. Portanto, devem ser feitos estudos sobre o gosto e preferências específicas dos consumidores (Pedrão e Coro, 1999). Na verdade, a análise sensorial é a única realizada pelos consumidores, razão pela qual é tão importante ser efectuada antes de comercializar o produto.

A análise sensorial do mel permite distinguir a sua origem botânica e identificar e quantificar certos defeitos, tais como fermentações, impurezas, odores e sabores não característicos. Cumpre ainda um papel importante na definição das normas do produto em relação às denominações botânicas ou outros rótulos específicos. Além disso, é uma parte essencial dos estudos de preferência/aversão do consumidor. Em particular, a avaliação sensorial é importante na verificação da conformidade dos méis monoflorais, uma vez que pode revelar a presença de componentes botânicos que não são detetados por outros métodos analíticos (análises físico-químicas e melissopanológicas), mas que, no entanto, podem alterar as características sensoriais típicas, de tal modo que o mel não pode ser comercializado como monofloral (Piana *et al.*, 2004)

Apesar da falta de informações sobre a qualidade sensorial do mel, a sua avaliação contribuirá para alcançar um maior valor comercial (Silva *et al.*, 2012).

### **1.2.5.1. Métodos de análise sensorial**

A análise sensorial é uma ferramenta imprescindível para aferir os gostos dos consumidores. Com a aplicação dos métodos de análise sensorial, é possível transformar dados subjectivos em resultados objetivos. Estes métodos são de extrema importância, pois uma correcta escolha e aplicação destes irão definir o sucesso ou não do estudo.

A classificação dos métodos sensoriais é dada em função do objetivo geral do teste (Biedrzycki, 2008). Sendo assim, existem três tipos de métodos sensoriais: o método discriminativo (para determinar diferenças entre produtos), o método descritivo (para especificação de atributos) e o método hedónico ou afetivo (determinam se o consumidor gosta ou não gosta do produto).

Neste trabalho, iremos somente fazer referência à análise descritiva quantitativa (ADQ) utilizando um painel de consumidores, pois, foi o método utilizado, dada a natureza de respostas que necessitávamos.

Este método, de nome original “quantitative descriptive analysis” (ADQ), foi desenvolvido por Stone e Sidel em 1985 (Alves, 1994). Através desta metodologia podemos descrever os alimentos pelos seus atributos sensoriais, considerados mais relevantes pelos membros do painel de provadores. Esses atributos são expressos em linguagem comum e quantificados em escalas apropriadas (Murray *et al.*, 2001).

Análise descritiva quantitativa (ADQ), também conhecida por perfil convencional – Método ISO 11035:1994, utiliza-se quando estamos interessados em qualidades sensoriais complexas, e multidimensionais de um produto/amostra, como a consistência, cor, aroma e sabor (Grosso, 2006).

### **1.2.5.2. Painel de provadores**

De acordo com NP-ISO 8586:2001 os painéis de análise sensorial podem compreender três tipos de participantes: provadores, provadores qualificados e peritos.

Neste trabalho, apenas iremos fazer referência ao painel de provadores consumidores não treinados.

Hoje em dia, em função da atual competitividade dos mercados, considerar as preferências individuais dos consumidores tem sido essencial para a indústria que

procura identificar consumidores potenciais e dirigir a otimização e a venda de produtos (Villanueva, 2003).

O painel de consumidores são pessoas escolhidas ao acaso e sem nenhum tipo de treino, que valorizam as amostras por comparação indicando o grau de preferência (Rodrigues, 2007). De acordo com Köster (1998), Eguía (2001) e Pérez-Elortondo (2001), é importante que estes sujeitos sejam consumidores habituais ou potenciais do produto submetido a análise.

As provas realizadas por este tipo de painel apresentam uma grande variabilidade e os resultados são mais difíceis de interpretar, uma vez que reproduzem opiniões completamente pessoais (Paulos, 2012).

A seleção dos consumidores pode ser efetuada tendo em consideração fatores como a idade, o género, a localização geográfica, a religião, a educação, a profissão, o estado civil, entre outros (Paulos, 2012). O grupo constituído deve ser relativamente homogêneo e representativo do consumidor alvo do produto. São necessárias no mínimo 30 pessoas não treinadas. No entanto, recomenda-se até 100 pessoas para que os resultados sejam válidos, do ponto de vista estatístico, devendo definir-se bem a hipótese a testar assim como o desenho experimental, tendo em conta que logo após a seleção, se iniciam os testes de consumo (Miller, 1998; Eguía, 2001).

### **1.2.5.3. Características sensoriais do mel**

Do ponto de vista sensorial, a avaliação de alimentos é uma disciplina integrada que permite definir a qualidade do produto com base nas suas características sensoriais. A análise sensorial também se relaciona com a medição e quantificação das características dos alimentos avaliadas pelos sentidos humanos. Neste contexto, o controlo da qualidade do mel é feita considerando-se as seguintes características: consistência, cor, aroma e sabor (Grosso, 2006).

O primeiro contato do consumidor com um produto, geralmente, é com a apresentação visual, onde se destacam a cor e a aparência. Todo o produto possui uma aparência e uma cor esperadas que são associadas às reações pessoais de aceitação, indiferença ou rejeição (Teixeira, 2009). A cor do mel é um dos fatores mais importantes na determinação do seu preço no mercado mundial e um dos parâmetros que mais influencia na aceitabilidade do produto, afetando desta forma a preferência do

consumidor (Arnaud *et al.*, 2008). Como referido anteriormente, a cor do mel apresenta várias tonalidades, nomeadamente o branco-água, extra-branco, branco âmbar, âmbar claro, âmbar e âmbar escuro, podendo ser resumido em mel claro e mel escuro (Alves, 2009). O sabor dos alimentos é uma resposta às sensações do gosto, do odor e da perceção bucal. O gosto é o sentido que nos permite identificar o sabor dos diferentes alimentos. Este atua por contato das substâncias solúveis dos alimentos com a língua e saliva, dependendo dos recetores que são estimulados pelas substâncias químicas. Assim, o ser humano torna-se capaz de perceber uma gama ampla de sabores como resposta à combinação dos vários estímulos (Landívar,2001). O aroma é uma propriedade organoléptica perceptível pelo órgão olfativo quando se aspiram determinadas substâncias voláteis. Atribui-se o gosto aos componentes não voláteis e o aroma é derivado de dezenas ou centenas de substâncias voláteis. O sabor do mel está relacionado com as diversas substâncias complexas, principalmente os componentes de baixo peso molecular das plantas de origem (Ferreira *et al.*, 2007). O aroma e sabor estão relacionados diretamente com a cor do mel. Quanto mais escuro for o mel, mais rico em minerais e, conseqüentemente, mais forte o seu aroma e sabor. O mel claro normalmente apresenta uma baixa taxa de minerais e por isso um sabor e um aroma mais leves (Lengler, 2004).

A consistência do mel é conferida pela viscosidade podendo apresentar-se fluido, espesso, ou parcialmente ou totalmente cristalizado (Decreto-lei nº214/2003). A cristalização do mel é uma característica intrínseca, que interfere diretamente no tempo de armazenamento e aceitação comercial por parte do consumidor, o qual associa o mel cristalizado a um produto de baixa qualidade ou adulterado (Bogdanov *et al.* 1999).

# Capítulo 2

*Material e métodos*



## 2.1. Amostras de mel

As amostras de mel utilizadas neste estudo eram provenientes de zonas distintas do concelho de Vimioso.

No laboratório, as amostras de mel foram armazenadas num local escuro até efectuar as primeiras análises. Quatro amostras de mel foram armazenadas à temperatura ambiente (20-25°C) e enroladas em alumínio para proteger do efeito da luz; quatro amostras foram armazenadas no frigorífico (4°C); e as outras quatro amostras na estufa a 45°C. As doze amostras foram armazenadas durante 4 meses, efetuando-se as respetivas análises físico-químicas e microbiológicas na sua receção, ao fim de dois meses e aos quatro meses de armazenamento.

No que diz respeito à análise sensorial usaram-se as amostras armazenadas à temperatura ambiente.

## 2.2. Análise polínica

A determinação da origem botânica das amostras baseou-se na análise do espectro polínico usando o método proposto por Louveaux *et al.* (1978). A análise foi efectuada pelo método da preparação de lâminas sem acetólise. Para tal, pesaram-se 10g de mel e dissolveram-se em 10mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% (água acidificada). Esta solução foi colocada em banho-maria a 40°C para se dissolver completamente. Em seguida, distribui-se por 2 tubos de centrífuga aproximadamente 10mL da solução e acrescentou-se 5mL de água. Os tubos contendo a solução foram a centrifugar durante 10 minutos a 2600 rpm. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, e o precipitado foi lavado com 10mL de água destilada e cuidadosamente agitado para remover completamente os açúcares do mel e dispersar novamente o sedimento. Verteu-se a solução para novos tubos, centrifugou-se e desprezou-se o sobrenadante. Por fim, efectuou-se a preparação das lâminas com uma gota de sedimento e uma gota de glicerogelatina, fixada à chama e solidificada antes da observação. O exame das lâminas contendo os grãos de pólen foi realizada com um microscópio óptico a 400× e 1000×, a fim de fazer a identificação e quantificação de todos os tipos de pólen. De modo a reconhecer os diferentes tipos de pólen, utilizou-se a colecção de referência da Escola Superior Agrária de Bragança.

## 2.3. Caracterização físico-química do mel

### 2.3.1. Humidade

A humidade foi determinada de acordo com o método refractométrico descrito em Anónimo (1986). Este método consistiu na determinação do índice de refração das diferentes amostras utilizando-se um refratómetro Abbe (digital refractómetro Atago, Alemanha) (Fig.5). Todas as medições foram realizadas a 20°C e os resultados expressos em % (p/p).



**Figura 5** - Refratómetro Abbe.

### 2.3.2. Condutividade eléctrica

A condutividade eléctrica do mel foi determinada de acordo com o método descrito em Sancho *et al.* (1991). Pesaram-se rigorosamente 10g de mel e dissolveram-se em 75mL de água destilada. A solução foi colocada em banho-maria a 20°C até atingir o equilíbrio. Em seguida, fez-se a leitura da amostra num condutivímetro (Inolab, 1999) (Fig.6.).

A condutividade obteve-se multiplicando por 1,50 Sancho *et al.* (1991) o valor obtido e os resultados expressaram-se em mS/cm ( $10^{-3}$  S/cm).



**Figura 6 - Condutivimetro (Inolab, 1999).**

### **2.3.3. Cinzas totais**

O conteúdo de cinzas do mel foi determinado por condutivimetria, de acordo com a metodologia proposta por Sancho *et al.* (1991). Depois de determinada a condutividade, quando o resultado obtido foi inferior a  $0,9 \times 10^{-3}$  S/cm, converteu-se o valor em  $10^{-4}$  S/cm e determinou-se o teor em cinzas consultando a tabela apresentada em Sancho *et al.* (1991). Quando o resultado obtido para a condutividade foi superior a  $0,9 \times 10^{-3}$  S/cm, calculou-se a percentagem de cinzas totais através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ cinzas totais} = 0,83 \times \text{condutividade} - 0,092$$

### **2.3.4. pH**

O pH do mel foi determinado de acordo com o método apresentado por Bogdanov *et al.* (1997). Pesaram-se rigorosamente 10g de mel e dissolveram-se em 75mL de água destilada. A solução foi colocada em banho-maria a 20°C até atingir o equilíbrio. O pH foi determinado pela leitura direta com um medidor de pH (Meter Basic 20, 2002).

### **2.3.5. Acidez livre**

A acidez livre foi determinada por titulação volumétrica de acordo com o método apresentado por Bogdanov *et al.* (1997) (fig. 7). Dissolveram-se 10g de mel em

75mL de água destilada e adicionaram-se 4 a 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína (indicador). De seguida, esta solução foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N a pH 8,3, recorrendo-se a um medidor de pH (Meter Basic 20, 2002), até a viragem de coloração se manter 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.



**Figura 7** - Determinação da acidez livre.

### **2.3.6. Açúcares redutores**

O teor de glucose e frutose do mel foi determinado de acordo com o método descrito em Bogdanov *et al.* (1997). Pesaram-se com precisão 2g de mel homogeneizado e dissolveram-se em 50mL de água destilada, em seguida transferiram-se para um balão volumétrico de 200mL e fez-se o volume com água destilada (solução de mel). Retiraram-se 50mL desta solução de mel para um balão volumétrico de 100mL e completou-se o volume com água destilada (solução diluída de mel).

Para determinar o volume de água que é necessário adicionar à amostra para assegurar que a redução se efetua a um volume contante foi necessário proceder a uma titulação preliminar. Num copo graduado de 250mL, adicionaram-se 5mL da solução de Fehling A, 5mL da solução de Fehling B, 7mL de água destilada e 14mL da solução

diluída de mel, previamente colocada numa bureta de 25mL. Aqueceu-se até à ebulição e ferveu durante 2 minutos, adicionando-se em seguida 1mL de azul metileno 0,2%. Titulou-se esta solução com pequenas adições de solução diluída de mel contida na bureta até haver descoloração do indicador. O volume total de solução diluída de mel gasto na titulação foi subtraído a 25mL, correspondendo o valor obtido ao volume de água usado na dosagem.

Para dosagem, num copo graduado de 250mL adicionaram-se 5mL da solução de Fehling A, 5mL da solução de Fehling B, o volume de água destilada determinado na titulação preliminar e 12,5mL da solução diluída de mel contida na bureta. Aqueceu-se até à ebulição e ferveu durante 2 minutos, adicionando-se em seguida 1mL de azul metileno 0,2%. Titulou-se esta solução com pequenas adições de solução diluída de mel contida na bureta até haver descoloração do indicador.

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

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

C = g de açúcar invertido por 100 g de mel

P = peso da amostra de mel

V = volume da solução diluída de mel

### **2.3.7. Sacarose aparente**

A sacarose aparente foi determinada pelo Método de Inversão descrito por Bianchi (1990). A preparação da solução de mel e da solução diluída é a mesma referida anteriormente para os açúcares redutores. Aqueceu-se até 64°C em banho-maria. Após ter atingido a temperatura, retirou-se do banho-maria, adicionou-se 10mL HCL 6,34N e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Depois de arrefecer, deixou-se repousar aproximadamente 15 minutos. Em seguida, neutralizou-se com NaOH 5N utilizando papel indicador e completou-se o volume até 100mL com água destilada (solução diluída de mel).

Os procedimentos para a titulação preliminar e a dosagem são idênticas aos referidos para a determinação dos Açúcares Redutores.

Para a determinação do teor de sacarose aparente utilizou-se a seguinte expressão:

$$\text{Teor de sacarose} = (\text{sacarose aparente} - \text{açúcares redutores}) \times 0,95$$

### **2.3.8. HMF**

O HMF foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Anónimo (1986). Pesaram-se rigorosamente 5g de mel e dissolveram-se em 25mL de água destilada. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50mL ao qual foram adicionados 0,5mL de solução Carrez I e 0,5mL de solução Carrez II, agitou-se e perpez-se o volume com água destilada. Em seguida, filtrou-se com papel de filtro a solução desprezando-se os primeiros 10mL de filtrado e recolheram-se alíquotas de 5mL para dois tubos de ensaio. A um dos tubos adicionaram-se 5mL de água destilada (amostra) e ao outro tubo 5mL de solução bissulfito sódio 0,2% (referência). Agitou-se vigorosamente e leu-se a absorvância das soluções a 284 e 336nm utilizando-se cuvete de quartzo de 1cm num espectrofotómetro UV-visível (Varian Cary 50 Scan model, 1998).

Nas absorvâncias superiores a 0,6 dilui-se a solução da amostra com água e a solução de referência com bissulfito sódio a 0,1% e leu-se a absorvância.

O valor de HMF foi determinado através da seguinte fórmula:

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

### **2.3.9. Índice diastásico**

O Índice Diastásico foi determinado de acordo com o método descrito por Anónimo (1986). Pesou-se com precisão 10g de mel num copo graduado de 50mL e adicionaram-se 5mL de tampão acetato pH 5,3 e 20mL de água destilada para dissolver a amostra. Num balão volumétrico de 50mL colocaram-se 3mL de cloreto de sódio 0,5M e adicionou-se a solução de mel. Perpez-se o volume com água destilada. Transferiram-se 10mL desta solução para dois balões volumétricos de 50mL 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 5mL da solução de amido para a solução de mel contida num dos balões (solução amostra) e 5mL de água destilada para o outro balão (solução referência). Agitou-se e começou-se a contar o tempo de reacção. Em intervalos de tempo de 5 minutos, transferiram-se 1mL dos balões de referência e amostra para balões volumétricos de 50mL que continham 10mL de solução de iodo 0,0007N e 35mL de água destilada. Leu-se a absorvância da solução amostra a 660nm, utilizando como branco a solução referência, num espectrofotómetro UV-visível (Varian Cary Scan model,(1998)). A absorvância da amostra foi lida de 5 em 5 minutos até atingir um valor inferior a 0,235. Para determinar o momento (tempo) em que a absorvância atingiu esse valor, construiu-se um gráfico de absorvância em função do tempo (minutos). A recta 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:

$$ID = \frac{300}{t}$$

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

#### **2.3.10. Cor**

A cor do mel foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico, desenvolvido pelo Prof. Mario Bianchi (Montenegro *et al.*, 2005). Pesaram-se 5g de mel num tubo de falcon de 50mL e dissolveram-se em 10mL de água desionizada. A solução preparada foi colocada numa cuvete de plástico e deixou-se repousar durante 10 a 15 minutos antes de efectuar a leitura. Leu-se a absorvância das amostras num espectrofotómetro UV-visível (Varian Cary Scan model,1998), a 650nm, utilizando como branco, água destilada.

Para a determinação da cor do mel calculou-se o valor em mm Pfund a partir do valor da absorvância com a ajuda da seguinte expressão:

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

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

## **2.4. Análises microbiológicas**

A análise microbiológica foi efectuada 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.

### **2.4.1. 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, 10g de amostra e homogeneizadas com 90mL de água peptonada (diluição  $10^{-1}$ ). Após homogeneização da amostra, procedeu-se à preparação das diluições decimais ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), transferindo assepticamente 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 9mL de diluente.

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

### **2.4.2. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos**

Para a contagem de microrganismos aeróbios totais procedeu-se à sementeira por incorporação. Transferiu-se 1mL 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 15mL 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 72h. 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:

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

Onde:

$\sum c$  – 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.

### **2.4.3. 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 0,1mL 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.

### **2.4.4. 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 100mL de água estéril. Em tubos de ensaio foram colocados 9mL de meio de cultura previamente hidratado com 1mL 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 48h. 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.

#### **2.4.5. Pesquisa de esporos de Clostrídeos sulfito-redutores**

A pesquisa de esporos de Clostrídeos foi realizada de acordo com a NP-2262:1986. Em tubos de ensaio estéreis colocaram-se 5mL e 10mL de amostra. Os tubos foram colocados em banho-maria a 80°C, durante 10 minutos para inactivar a amostra. Após inactivação 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 48h. Consideram-se positivas as placas em que apareceu um precipitado negro à volta das colónias.

#### **2.4.6. Contagem de Estafilococos coagulase positiva pela técnica de cultura com confirmação de colónias**

A pesquisa de *Staphylococcus aureus* foi efectuada de acordo com a NP 4400-1:2002, por sementeira e espalhamento à superfície de 0,1mL de cada diluição em placas de Petri contendo o meio selectivo de Baird-Parker enriquecido com gema de ovo. Incubaram-se as placas invertidas a 37°C ± 1°C durante 48h ± 4h. 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 48h) 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).

As colónias características e não características para posterior pesquisa da enzima coagulase positiva foram repicadas e semeadas em tubos com meio BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37°C durante 20h a 24h. Após o período de incubação, adicionou-se assepticamente 0,1mL de cada cultura a 0,3mL de plasma de coelho em

tubos de hemólise e incubou-se a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 4 a 6h. Por último, analisou-se a coagulação do plasma, considerando-se reacção coagulase positiva quando o coágulo ocupou mais de  $\frac{3}{4}$  do volume inicial ocupado pelo líquido.

#### **2.4.7. Isolamento e identificação de leveduras**

Algumas colónias isoladas foram seleccionadas 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  $25^{\circ}\text{C}$ . 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 5mL 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 fracção de colónia isolada para obter uma suspensão de opacidade equivalente a 2 McFarland num tubo de ensaio contendo 2mL de NaCl 0,85%. Em seguida, 100 $\mu\text{l}$  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  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48-72h. 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 reacção positiva a anotar na ficha de resultados. A galeria foi novamente incubada até completar o período de 72h conforme a orientação do fabricante. Após as 72h, 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 <sup>TM</sup> fornecido pela empresa identificar a espécie de levedura



**Figura 8 - Galeria API 20C AUX.**

## **2.5. Análise sensorial**

A análise sensorial dos diferentes méis foi realizada através de um painel de consumidores, formado por 50 provadores. Para cumprir estes objetivos, foram contactadas e convidadas a participar, pessoas dentro da comunidade do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), entre os quais, alunos, funcionários docentes e não docentes, assim como fora da comunidade do IPB. A prova sensorial teve lugar junto aos Serviços Centrais do Instituto Politécnico de Bragança.

As amostras foram servidas em copos de plástico descartáveis, previamente identificados com um código de letras e números diferentes, cuja correspondência não era conhecida pelos provadores, contendo cerca de 15mL de mel, sendo a ordem de apresentação aleatória. Os consumidores dispuseram ainda de um guardanapo, água mineral sem gás servida à temperatura ambiente e bolachas sem sal para limpeza da boca entre a degustação das amostras e a respectiva ficha de avaliação onde constavam os atributos a estudar, nomeadamente, a consistência, a cor, o aroma, o sabor e a apreciação global.

Inicialmente foi dada uma pequena explicação ao consumidor sobre o modo correcto de proceder à prova. Os provadores começaram por indicar a idade, sexo, naturalidade e a frequência de consumo do produto. Em seguida, avaliaram o produto através de uma escala hedónica estruturada de nove pontos (1 indicava ser muito desagradável e 9 muito agradável) para cada um dos atributos. A ficha utilizada na avaliação das amostras pelo painel de consumidores encontra-se em anexo.

Para a análise estatística dos dados utilizou-se um computador munido de vários programas, nomeadamente: Microsoft Excel 2010 e, XLSTAT 2013.4.07, envolvendo análises de regressão simples e multivariada, análise de variância, análise de

componentes principais (ACP) e análise de Procrustes generalizada (APG), aplicando-se o teste de F ao nível de significância de 5%.



**Figura 9** – Prova sensorial.

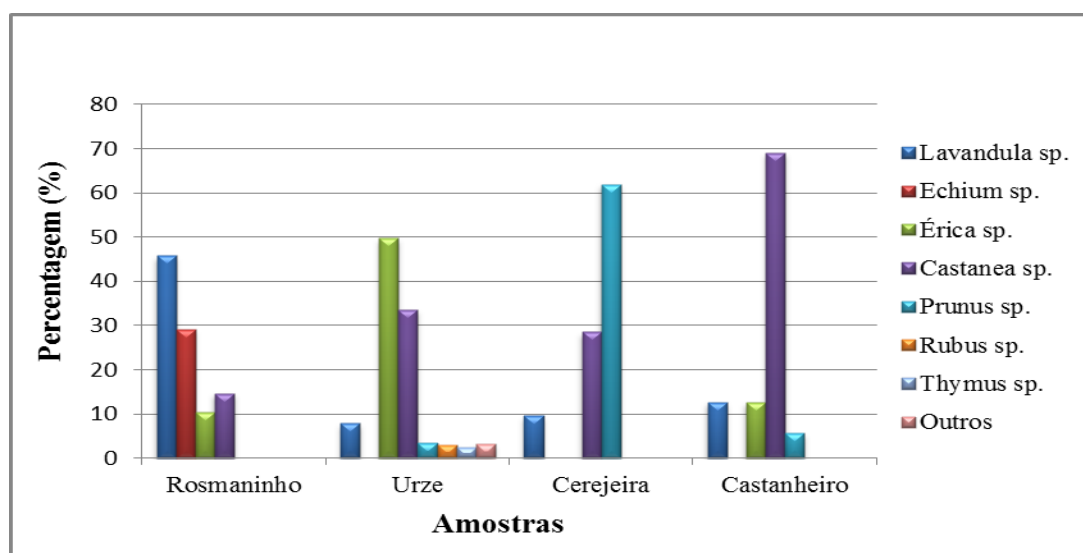
# Capítulo 3

*Resultados e  
discussão*



### 3.1. Análise polínica

A análise do perfil polínico do mel permite determinar a sua origem floral através da identificação e contagem do pólen por exame microscópico. Os pólenes identificados e a sua frequência nos méis estudados são apresentados na Figura 10.



**Figura 10** - Caracterização polínica das amostras de mel utilizadas.

As principais diferenças entre os méis analisados são o tipo e a quantidade de pólen neles presentes. Analisando o gráfico verifica-se que os méis analisados são de origem monofloral, pois apresentaram como pólen dominante o de *Lavandula sp.* (45,83%), *Érica sp.* (49,69 %), *Prunus sp.* (61,91 %) e *Castanea sp.* (69,01%), respetivamente. De acordo com Maia *et al.* (2005), o mel para ser considerado monofloral de um pólen tem que apresentar, pelo menos 45 % desse pólen. No entanto, dependendo do tipo de mel existem algumas exceções. É o caso do mel de rosmaninho que apesar de apresentar uma percentagem de pólen de *Lavandula* superior a 45%, este necessita apenas de 15% de pólen de *Lavandula sp.* para ser considerado monofloral. Por outro lado, o mel de castanheiro para ser considerado monofloral necessita no mínimo de 70% de polén de *Castanea sp.*.

### **3.2. Caracterização físico-química**

Na Tabela 3, apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos das amostras de mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico.

**Tabela 3-** Parâmetros físico-químicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico.

Mel	Amostra	Tempo (meses)	Humidade (%)	pH	Condutividade (mS/cm)	Cinzas Totais (%)	Acidez Livre (meq.Ac/Kg)	Açúcares Redutores (%)	Sacarose Aparente (%)	HMF (mg/Kg)	I.D. (Escala de Gothe)	Cor (mmPFund)
Rosmaninho		0	16,4	3,76	0,39	0,22	33	66,24	3,52	29,85	7,19	53,97
	20-25°C	2	16,6	3,72	0,39	0,22	16	68,02	2,35	34,36	7,72	63,70
		4	17,8	4	0,38	0,22	15	68,03	1,81	45,25	7,82	73,42
	45°C	2	16,3	3,77	0,39	0,23	25	62,66	3,89	300,6	2,23	60,83
		4	16,8	3,77	0,39	0,23	17	58,82	4,25	782,33	0,83	98,68
	4°C	2	16,8	3,77	0,38	0,23	15	65,80	2,81	36,15	7,63	62,40
		4	16,9	3,86	0,39	0,23	15	65,36	2,1	41,05	8,67	70,82

**HMF** – Hidroximetilfurfural; **I.D.** – Índice diastásico

**Tabela 3** - Parâmetros físico-químicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico. (Continuação).

Mel	Amostra	Tempo (meses)	Humidade (%)	pH	Condutividade (mS/cm)	Cinzas Totais (%)	Acidez Livre (meq.Ac/Kg)	Açúcares Redutores (%)	Sacarose Aparente (%)	HMF (mg/Kg)	I.D. (Escala de Gothe)	Cor (mmPFund)
Urze	20-25°C	0	16,3	4,38	0,92	0,70	33	68,19	1,04	20,12	12,43	145,63
		2	16,4	4,44	0,92	0,67	16	67,57	4,15	23,60	11,12	146,05
		4	17,1	4,92	0,91	0,66	13	63,29	5,84	27,08	9,8	195,39
	45°C	2	16,7	4,38	0,91	0,68	20	66,66	2,05	120,51	4,15	170,39
		4	16,9	4,14	0,89	0,65	19	61,73	3,05	448,95	1,2	252,17
	4°C	2	16,8	4,63	0,92	0,68	12	67,57	1,16	25,56	12,35	146,79
		4	17,1	4,66	0,91	0,66	14	66,23	1,27	30,99	11,81	180,46

**HMF** – Hidroximetilfurfural; **I.D.** – Índice diastásico

**Tabela 3** - Parâmetros físico-químicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico. (Continuação).

Mel	Amostra	Tempo (meses)	Humidade (%)	pH	Condutividade (mS/cm)	Cinzas Totais (%)	Acidez Livre (meq.Ac/Kg)	Açúcares Redutores (%)	Sacarose Aparente (%)	HMF (mg/Kg)	I.D. (Escala de Gothe)	Cor (mmPFund)
Cerejeira		0	16	4,09	0,64	0,43	36	67,70	2,91	24,41	10,08	69,43
	20-25°C	2	16,2	4,09	0,56	0,38	18	67,19	1,69	34,54	10,75	78,69
		4	16,8	4,08	0,49	0,32	15	66,67	0,42	39,84	4,87	87,94
	45°C	2	16,9	4,01	0,67	0,46	28	66,66	2,65	194,01	3,86	118,03
		4	17,1	4,03	0,70	0,49	20	63,29	2,38	484,43	1,06	189,82
	4°C	2	16,2	3,99	0,54	0,36	18	67,11	3,14	26,06	11,2	76,03
		4	16,8	3,89	0,50	0,33	15	64,94	3,37	27,71	6,46	82,67

**HMF** – Hidroximetilfurfural; **I.D.** – Índice diastásico

**Tabela 3** - Parâmetros físico-químicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico. (Continuação).

Mel	Amostra	Tempo (meses)	Humidade (%)	pH	Condutividade (mS/cm)	Cinzas Totais (%)	Acidez Livre (meq.Ac/Kg)	Açúcares Redutores (%)	Sacarose Aparente (%)	HMF (mg/Kg)	I.D. (Escala de Gothe)	Cor (mmPFund)
<b>Castanheiro</b>		0	16	4,65	1,16	0,87	45	65,79	1,83	10,91	16,00	132,51
	20-25°C	2	16,6	4,63	1,17	0,88	19	64,52	3,45	24,45	17,35	134,37
		4	16,9	4,49	1,13	0,85	22	62,5	3,13	37,99	13,83	165,49
	45°C	2	16,3	4,5	1,19	0,89	26	60,24	1,79	209,57	5,01	171,51
		4	16,8	4,21	1,11	0,83	35	59,52	1,74	408,23	0,86	296,06
	4°C	2	16,8	4,70	1,17	0,88	33	65,79	1,76	22,79	18,46	129,91
		4	16,8	4,73	1,18	0,89	20	65,79	1,69	34,66	21,07	165,6

**HMF** – Hidroximetilfurfural; **I.D.** – Índice diastásico

### 3.2.1. Humidade

O teor máximo de água presente no mel é o único critério de composição que tem de ser cumprido por todos os méis do comércio mundial. O conhecimento do seu teor é útil para melhorar a sua conservação e armazenamento, uma vez que impede o crescimento à superfície de fungos tais como *Penicillium* e *Mucor* (Estevinho *et al.*, 2012).

O mel de rosmaninho apresentou nas três condições de armazenamento um aumento da humidade, apresentando um valor máximo de 17,8% para a amostra armazenada à temperatura ambiente e um valor mínimo de 16,3 % para a amostra mantida na estufa a 45°C. Em relação ao mel de urze, também se verificou um aumento do seu teor, com valores que oscilaram entre 16,3% e 17,1%, sendo as amostras armazenadas à temperatura ambiente e no frigorífico as que apresentaram o valor mais elevado. O mel de cerejeira apresentou um aumento da humidade ao longo dos 4 meses nas diferentes condições de armazenamento. Os valores para o mel de cerejeira variaram entre 16% e 17,1%, em que a amostra a 45°C apresentou o valor mais elevado. Constatou-se também um aumento da humidade no mel de castanheiro ao longo dos 4 meses, à excepção da amostra mantida no frigorífico que apenas verificou um aumento nos primeiros dois meses. Os valores oscilaram entre 16 e 16,9%, observando-se que a amostra a 45°C foi a que apresentou o maior teor de humidade.

As amostras de méis apresentaram teores de humidade inferiores a 20%, o valor máximo imposto pela legislação.

Bertoldi *et al.* (2007) afirmam que teores de humidade inferiores aos limites estabelecidos pela legislação aumentam o tempo vida de prateleira do produto, uma vez que propiciam condições desfavoráveis ao crescimento microbiano.

O aumento da humidade nas amostras mantidas à temperatura ambiente pode ser devido ao mel ser um produto higroscópico, o que significa que pode absorver e reter a humidade do ambiente durante um armazenamento inadequado em locais húmidos e embalagens mal fechadas (Marchini *et al.*, 2005; Vargas, 2006).

Por outro lado, a cristalização pode ser a principal causa do aumento da humidade do mel armazenado no frigorífico, uma vez que envolve a coexistência de ambas as fases líquida e cristalina durante certo tempo. Na fase líquida remanescente, a atividade da água torna-se maior do que a do mel líquido original devido à libertação de água a partir da fase sólida, como a consequente formação de cristais (Tosi *et al.*, 2004).

De um modo geral, um teor de humidade elevado pode induzir a fermentação do mel durante o armazenamento, provocando a sua deterioração e perda de sabor e também uma diminuição do seu tempo de vida útil (Rodríguez *et al.*, 2004; Al *et al.*, 2009; Escriche *et al.*, 2009).

### 3.2.2. pH

Os valores de pH não se encontram padronizados pela legislação. Embora a sua determinação no controlo da qualidade do mel não seja obrigatória, este parâmetro mostra-se útil, por ter influência na formação do HMF.

Além disso, este parâmetro é um fator importante durante a extracção e armazenamento do mel, visto estar relacionado com a estabilidade e a vida de prateleira do produto (Terrab *et al.*, 2004).

Como se pode observar na Tabela 3, o mel de rosmaninho apresentou um ligeiro aumento do pH na amostra armazenada à temperatura ambiente nos últimos dois meses, enquanto as amostras a 45°C e no frigorífico mantiveram-se constantes. Os valores variaram entre 3,76 e 4 sendo a amostra armazenada à temperatura ambiente a que apresentou o pH mais elevado. Em relação ao mel de urze, constatou-se que o pH manteve-se praticamente constante ao longo do período independentemente das condições de armazenamento. O valor máximo obtido foi de 4,92 para a amostra à temperatura ambiente e o valor mínimo de 4,14 para a amostra armazenada a 45°C. Relativamente ao mel de cerejeira, as amostras armazenadas à temperatura ambiente e a 45° mantiveram-se constantes ao longo dos quatro meses, enquanto na amostra armazenada no frigorífico verificou-se uma ligeira diminuição. Este mel apresentou um valor máximo de 4,09 na sua globalidade e um valor mínimo de 3,89 para a amostra sob refrigeração. Quanto ao mel de castanheiro, o pH manteve-se constante em todas as condições de armazenamento. O valor máximo para este tipo de mel foi 4,73 para a amostra mantida no frigorífico e o valor mínimo de 4,21 para a amostra a 45°C.

O pH dos méis apresentaram-se dentro do limite proposto por Iurlina e Fritz (2005) (3,4 – 6,1).

Os resultados obtidos para a maioria das nossas amostras corroboram os de Jiménez *et al.* (1994) que ao estudarem a influência das condições de armazenamento (à temperatura ambiente e de refrigeração) sobre alguns parâmetros físico-químicos e micológicos do mel

mostraram que o pH era muito estável, isto é, praticamente constante ao longo de dois anos de armazenamento. Já Bath e Singh (2000) observaram que o pH diminuiu durante o aquecimento e armazenamento do mel, no entanto o armazenamento demonstrou o efeito mais pronunciado sobre este parâmetro.

Este parâmetro é de grande importância durante a extração e armazenamento de mel, visto influenciar a textura, a estabilidade e o tempo de vida útil (Terrab *et al.*, 2004).

### **3.2.3. Condutividade elétrica**

Durante o período em estudo, a condutividade elétrica do mel de rosmaninho nas diferentes condições de armazenamento manteve-se praticamente constantes, apresentando um valor máximo de 0,39mS/cm e um valor mínimo de 0,38mS/cm. A condutividade do mel de urze manteve-se constante ao longo do período em estudo nas diferentes condições de armazenamento, apresentando um valor máximo de 0,92mS/cm e um valor mínimo de 0,89mS/cm. Relativamente ao mel de cerejeira, observou-se uma diminuição nas amostras mantidas à temperatura ambiente e no frigorífico e um aumento na amostra mantida a 45°C. O valor máximo obtido foi de 0,70mS/cm para a amostra armazenada a 45°C e o mínimo foi de 0,49mS/cm para a amostra à temperatura ambiente. Em relação ao mel de castanheiro, a condutividade elétrica manteve-se constante ao longo do tempo independentemente das condições de armazenamento. Os valores para o mel de castanheiro variaram entre 1,11 e 1,19mS/cm. A condutividade elétrica de mel pode ser explicada considerando o teor de cinzas e a acidez, o que reflete a presença de iões e de ácidos orgânicos.

Os valores obtidos para a condutividade elétrica encontram-se dentro dos limites estipulados pela legislação. No entanto, os valores obtidos para este parâmetro foram superiores nos méis escuros, ou seja, nos méis de urze e castanheiro, uma vez que a condutividade elétrica está relacionada com o conteúdo mineral. Porém este parâmetro não depende exclusivamente do conteúdo mineral. Esta medição depende do teor em cinzas, ácidos orgânicos, proteínas e açúcares, por isso, quanto maior o seu conteúdo, maior será a condutividade resultante.

Segundo Persano Oddo *et al.* (1995) valores elevados de condutividade elétrica estão associados ao mel de castanheiro, enquanto valores baixos deste parâmetro estão associados ao mel de rosmaninho.

Castro-Vásquez *et al.* (2008) observaram um aumento da condutividade elétrica em méis armazenados a diferentes temperaturas em relação a méis frescos. Também, Almeida-Muradian *et al.* (2013), verificam um aumento deste parâmetro no mel *Melipona* armazenado ao longo de 12 meses.

#### 3.2.4. Cinzas

A percentagem de cinzas encontradas nas amostras de mel de rosmaninho manteve-se constante nas diferentes condições de armazenamento variando entre 0,22% e 0,23%. Relativamente às amostras de mel de urze constatou-se uma diminuição do teor de cinzas nas diferentes condições de armazenamento com um valor máximo de 0,70% e um valor mínimo de 0,65%. As amostras de mel de cerejeira armazenados à temperatura ambiente e no frigorífico apresentaram uma ligeira diminuição, enquanto a amostra armazenada a 45°C manteve-se constante ao longo do tempo. O valor máximo obtido foi de 0,49% para a amostra a 45°C e o valor mínimo de 0,32% para a amostra à temperatura ambiente. Em relação às amostras de méis de castanheiro nas diferentes condições de armazenamento mantiveram-se constantes, apresentando um valor máximo de 0,89% para a amostra no frigorífico e a 45°C e um valor mínimo de 0,83% para a amostra a 45°C.

Para esta variável, apenas os méis de urze e castanheiro excederam o limite legal de 0,60% (NP-1307, 1983), classificando-se como impróprios para consumo. Os valores acima do limite legal sugerem manipulação inadequado dos equipamentos ou ainda a não decantação e filtração no final do processo de retirada do mel pelo apicultor (Gois, 2011).

Tal como na condutividade elétrica, os méis escuros apresentaram um teor de cinzas mais elevado em comparação com os méis claros. Estas diferenças no teor de cinzas, podem ser atribuídas à diferente origem floral. Segundo Rodriguez *et al.* (2004) e Finola *et al.* (2007) o teor de cinzas do mel depende do material recolhido pelas abelhas na flora.

Tanto quanto sabemos, o efeito do armazenamento no teor de cinzas do mel nunca foi avaliado antes, dificultando assim a comparação dos resultados.

### 3.2.5. Acidez livre

No mel, a acidez livre é um importante parâmetro físico-químico, uma vez que é considerada como um indicativo de processos fermentativos.

Os valores para a acidez livre apresentaram uma diminuição nas amostras do mel de rosmaninho nas diferentes condições de armazenamento, com valores variando entre 15 e 33meq.Ac/kg. As amostras de mel de urze tiveram um comportamento parecido, apresentando um valor máximo de 33meq.Ac/kg e um valor mínimo de 12meq.Ac/kg para a amostra à temperatura ambiente. As amostras do mel de cerejeira e castanheiro nas diferentes condições de armazenamento apresentaram uma diminuição ao longo do tempo, obtendo um valor máximo de 36meq.Ac/kg e de 45meq.Ac/kg para a amostra de mel de cerejeira e para o mel de castanheiro e um valor mínimo de 15meq.Ac/kg e de 20 meq.Ac/kg, respectivamente. Os valores da acidez nos diferentes méis são inferiores ao tempo 0. Como a acidez é um dos parâmetros de avaliação do estado de maturação e da deterioração do mel e sabe-se que quando o mel começa a fermentar a acidez tende a aumentar, pelo que, podemos concluir que o mel durante o período de armazenamento não sofreu deterioração ou fermentação. Os valores de acidez das amostras de mel encontram-se dentro do limite estabelecido na legislação (50 miliequivalentes de ácidos por 1000 g de mel), indicando a ausência de fermentações indesejáveis do produto.

No mel, é possível ocorrerem alterações da acidez livre, uma vez que as enzimas tais como a glucose oxidase, que são activas após da colheita do mel, podem aumentar o valor deste parâmetro (Cavia *et al.*, 2007). Sendo assim, a diminuição da acidez livre no mel armazenado no frigorífico pode estar relacionado com uma diminuição da atividade desta enzima, induzida pela baixa temperatura, uma vez que a temperatura ótima da glucose oxidase é de 25-30°C (Bankar *et al.*, 2009)

Os nossos resultados não são corroborados pelas observações de Almeida-Muradian *et al.* (2013) que ao avaliar o efeito de diferentes técnicas e processos de conservação (temperatura ambiente (25°C), frigorífico (4°C) e congelador (-18°C)) sobre os parâmetros de qualidade do mel de *Melipona* armazenado durante 12 meses, verificaram que a acidez livre manteve-se quase contante mas com uma ligeira tendência para aumentar. Também, Castro-Vásquez *et al.* (2008) observaram um aumento da acidez livre em méis de *citrus* armazenados a diferentes temperaturas, principalmente durante o armazenamento a 40°C. O aumento da

acidez com o aquecimento e armazenamento prolongado foi também observado em méis de eucalipto por Kaur-Bath e Narpinder (2000).

### 3.2.6. Açúcares redutores

O mel é constituído principalmente pelos monossacarídeos glucose e frutose. Os resultados obtidos para os açúcares redutores (glucose e frutose) encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação.

A amostra do mel de rosmaninho mantida à temperatura ambiente apresentou um aumento no teor de açúcares redutores ao contrário das amostras mantidas a 45°C e no frigorífico que apresentaram uma diminuição do seu teor. Os valores para o mel de rosmaninho variaram entre 58,82% e 68,03%, sendo o valor mínimo verificado na amostra a 45°C e valor máximo na amostra à temperatura ambiente. Já as amostras do mel de urze apresentaram uma diminuição no teor de açúcares redutores ao longo do tempo independentemente das condições de armazenamento, verificando-se um valor máximo de 68,03% em todas as amostras e um valor mínimo de 61,73% na amostra a 45°C. O mel de cerejeira apresentou uma diminuição do teor de açúcares redutores ao longo do tempo nas diferentes condições de armazenamento, verificando-se um valor máximo de 67,70% na globalidade das amostras e um valor mínimo de 63,29% na amostra a 45°C. Em relação ao mel de castanheiro, as amostras à temperatura ambiente e a 45°C apresentaram uma diminuição do teor de açúcares redutores, enquanto a amostra armazenada no frigorífico manteve-se constante ao longo dos quatro meses, apresentando um valor máximo de 65,79% em todas as amostras e um valor mínimo de 59,52% na amostra a 45°C.

Segundo Silva *et al.* (2009) a concentração de açúcares redutores em amostras de méis é dependente do tempo de armazenamento.

A diminuição do teor de açúcares pode ser atribuída à atividade de certas enzimas ao longo do armazenamento (Paiva *et al.*, 2012). Um aumento do seu teor deve-se possivelmente, à transformação da sacarose em glucose provocada pela atividade enzimática da enzima invertase, visto que a inativação desta enzima se dá pelo aquecimento do mel.

Paiva *et al.* (2012), ao avaliarem alguns parâmetros físico-químicos de qualidade de méis de abelha (*Apis mellifera* L.), verificaram uma redução significativa dos açúcares redutores durante o período de armazenamento à temperatura ambiente.

### 3.2.7. Sacarose aparente

Quanto à sacarose aparente, também designada de açúcares não redutores, a legislação impõe um limite de 5g/100, excepto para o mel de citrinos e de eucalipto ( $\leq 10\text{g}/100\text{g}$ ), bem como para o mel de *lavandula* ( $\leq 15\text{ g}/100\text{g}$ ). Da análise dos resultados, constatou-se que o mel de rosmaninho apresentou uma diminuição da sacarose aparente em todas as condições de armazenamento, à excepção da amostra a 45°C que apresentou um aumento. A sacarose aparente variou entre 1,81% e 4,25%, sendo o valor mais baixo verificado na amostra à temperatura ambiente e o valor mais elevado na amostra a 45°C. Já no mel urze verificou-se um aumento da sacarose aparente nas amostras à temperatura ambiente e a 45°C ao contrário da amostra armazenada no frigorífico que manteve-se contante ao longo do período em estudo. O valor máximo de 5,84% foi verificado na amostra à temperatura ambiente e o valor mínimo de 1,04% na globalidade das amostras. O mel de cerejeira apresentou uma diminuição na amostra à temperatura ambiente e um aumento na amostra armazenada no frigorífico, enquanto a amostra a 45°C manteve-se constante ao longo do período, apresentando um valor máximo de 3,37% na amostra mantida no frigorífico e um valor mínimo de 0,42% na amostra à temperatura ambiente. Em relação ao mel de castanheiro, observou-se um aumento da sacarose aparente na amostra à temperatura ambiente nos primeiros dois meses, enquanto a amostra a 45°C e no frigorífico mantiveram-se constante. O valor máximo obtido para o mel de castanheiro foi de 3,45% para a amostra à temperatura ambiente e o valor mínimo de 1,69% para a amostra no frigorífico. Os resultados obtidos para a sacarose aparente encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação.

De acordo com Melo *et al.* (2003) a diminuição da sacarose, durante o armazenamento ocorre devido à acção das enzimas diastásicas. Paiva *et al.* (2012) verificaram uma redução significativa da sacarose durante o armazenamento do mel à temperatura ambiente.

### 3.2.8. Hidroximetilfurfural (HMF)

Entre os parâmetros mais importantes das análises físico-químicas, está o teor de HMF. Este parâmetro é bastante utilizado como um indicador de frescura do mel, uma vez que se encontra ausente em méis frescos e tende a aumentar durante o processamento e / ou envelhecimento do produto (Fallico *et al.*, 2006). Além do envelhecimento do próprio mel, as

concentrações de HMF aumentam em função de vários fatores, tais como: acidez livre, atividade da água, origem floral e más condições de armazenamento.

Pela análise dos resultados obtidos, verifica-se que todos os méis apresentaram nas três condições de armazenamento um aumento do teor de HMF ao longo do tempo, sendo este mais acentuado nas amostras armazenadas a 45°C. Neste caso, os valores obtidos excederam largamente os limites (40 mg/kg) estabelecidos pelo Codex Alimentarius e pela União Europeia. Observou-se que a amostra de mel de rosmaninho a 45°C foi a amostra que apresentou maior teor de HMF, apresentando um valor de 782,33 mg/kg.

Os valores de HMF obtidos nas amostras armazenadas à temperatura ambiente e no frigorífico foram inferiores ao obtido para o mel armazenado na estufa. Esta diferença já era esperada uma vez que o HMF é o produto intermediário mais importante de duas reações: a degradação de hexoses catalisada por ácidos e da reacção de Maillard, que é o índice mais utilizado para medir mel sobreaquecimento e/ou envelhecimento (Wang *et al*, 2004; Fallico *et al*, 2006),

Castro-Vázquez *et al.* (2008) também constataram um considerável aumento no teor de HMF ao longo do tempo. Almeida-Muradian *et al.* (2013), observaram um aumento do HMF à temperatura ambiente e uma ligeira diminuição na amostra armazenada no frigorífico. Moura *et al.* (2011) ao avaliarem a qualidade de méis de *Apis mellífera* Linnaeus armazenados à temperatura ambiente e sob refrigeração, também verificaram um aumento de HMF. Freitas *et al.* (2010) ao avaliarem o efeito do tratamento térmico no mel observaram um aumento deste parâmetro. Segundo Venturini (2007) citado por Alves *et al* (2012) quanto maior a concentração de HMF, menor será o valor nutricional do mel, devido à destruição por meio do aquecimento de determinadas vitaminas e enzimas.

Os nossos resultados são corroborados pelas observações de Homem (1988), White *et al.* (1978) e Bianchi (1989) citado por Melo *et al.* (2003), que verificaram que quando a temperatura é superior a 40°C, ocorre uma aceleração na formação de HMF a níveis superiores ao estabelecido pela legislação.

O aumento excessivo de HMF ao longo do período de armazenamento sugere perda de qualidade com o envelhecimento e possíveis riscos para a saúde dos consumidores, pois alguns estudos (Sapano *et al.*, 2006; Loise *et al.*, 2009) mostraram que o HMF está entre as substâncias de risco de citotoxicidade, genotoxicidade e atividade mutagénica.

### 3.2.9. Atividade diastásica

Assim como a avaliação do HMF, a determinação da atividade diastásica é um parâmetro extremamente importante na qualidade dos méis, devido à sensibilidade das enzimas diástases frente a condições de aquecimento. É um índice de frescura do mel, e diminui com o tempo de armazenamento e o aquecimento do mel.

Da análise da Tabela 4, verifica-se que a atividade diastásica diminuiu durante o período de armazenamento na maioria das amostras. No mel de rosmaninho, a amostra à temperatura ambiente e no frigorífico apresentaram um ligeiro aumento da atividade diastásica, enquanto na amostra a 45° a atividade diastásica diminuiu significativamente. O valor máximo obtido para o mel de rosmaninho foi de 8,67 na amostra mantida no frigorífico e o valor mínimo de 0,83 na amostra a 45°C. O armazenamento provocou no mel de urze e cerejeira uma diminuição da atividade diastásica independentemente das condições de armazenamento, sobretudo nas amostras armazenadas a 45°C. Os valores obtidos nestes méis variaram entre 1,2 e 12,43 e entre 1,06 e 21,07, respectivamente, sendo os valores mínimos obtidos nas amostras a 45°C. No mel de castanheiro constatou-se uma diminuição da atividade diastásica nas amostras a temperatura ambiente e 45°C, sendo a diminuição mais acentua a 45°C, enquanto a amostra mantida no frigorífico apresentou um aumento da sua atividade. Os valores para o mel de castanheiro oscilaram entre 0,86 e 21,07, sendo a amostra a 45°C a que apresenta o valor mais baixo.

Castro-Vázquez *et al.* (2008) também mencionaram uma redução da atividade diastásica ao longo do período de armazenamento em méis de *citrus*, sobretudo a 40°C. Num estudo realizado por Barbosa (2011) sobre a estabilidade do mel produzido em Portugal ao longo de 6 anos, verificaram um aumento progressivo na concentração do índice diastásico em méis de urze e do pomar. Alves *et al.* (2012), constataram uma diminuição da atividade diastásica ao longo de 180 dia de armazenamento. A diminuição da diástase pode estar relacionada com a sua desnaturação pela exposição durante o armazenamento (Alves *et al.*, 2012).

A atividade diastásica dos méis a 45°C foi inferior a 8 na escala Gothe, valor mínimo permitido pelos regulamentos, sugerindo armazenamento ou processamento inadequado.

### 3.2.10. Cor

Durante o período de estudo foi verificada a cor do mel, uma vez que o tempo de armazenamento, a luz, o calor e as possíveis reações enzimáticas podem afectar esta característica física.

A cor, primeira propriedade sensorial percebida pelos consumidores, que geralmente preferem méis claros, foi um dos parâmetros que mais variou durante o período de armazenamento. Como tal, as variações na cor do mel devem receber atenção especial. Observou-se um escurecimento de todos os méis submetidos a todas as condições de armazenamento, especialmente o do produto mantido a 45°C. No final dos quatro meses de armazenamento, o mel de castanheiro a 45°C foi a amostra que obteve o valor mais elevado (296,06 mmPFund) e o mel de rosmaninho no frigorífico a amostra que apresentou o valor mais baixo (70,82 mmPFund). Não existe consenso na literatura sobre a causa do escurecimento do mel, durante o armazenamento. Entretanto sabe-se que o escurecimento sofre influência da sua composição e cor inicial. A causa de escurecimento em mel tem sido atribuída, também, a reação de Maillard, caramelização de açúcares e reações de polifenóis (Gonzales *et al.*, 1999). De facto, durante o armazenamento prolongado, os lípidos podem gerar compostos carbonílicos através da oxidação e promover o escurecimento. De acordo com Bulut e Kilic (2009) os polifenóis podem formar complexos “marrom” com aminoácidos e proteínas, adicionalmente, as quinonas produzidas pela oxidação dos polifenóis podem estar também envolvidas em reações complexas que levam ao escurecimento dos méis. Gonzales *et al.* (1999) constataram que quanto maior a cor inicial do mel, maior a taxa de escurecimento durante o armazenamento a 37 ° C. O escurecimento observado para o mel refrigerado pode ser atribuído à cristalização do produto, uma vez que os cristais podem ter influenciado na leitura óptica da cor do mel. Almeida-Muradian *et al.* (2013), avaliando o efeito de diferentes técnicas e processos de conservação sobre os parâmetros de qualidade do mel de *Melipona* armazenado durante 12 meses, também verificaram um escurecimento do mel nas diferentes condições de armazenamento. Paiva *et al.* (2012) observaram um acentuado aumento da cor em méis escuros após o armazenamento.

### **3.3. Caracterização microbiológica**

Os resultados obtidos para as análises microbiológicas das amostras de mel armazenadas aos 0, 2 e 4 meses à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico estão sumariadas na Tabela 4.

**Tabela 4** - Parâmetros microbiológicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico.

Mel	Amostra	Tempo (meses)	Mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Sulfitos redutores (em 0,01g)
<b>Rosmaninho</b>		0	1,90×10 <sup>2</sup>	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
	20-25°C	2	<10	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
		4	<10	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
	45°C	2	<10	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
		4	<10	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
	4°C	2	<10	<10	<10	8,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
		4	<10	<10	<10	8,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente

**Tabela 4** - Parâmetros microbiológicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico (Continuação).

Mel	Amostra	Tempo (meses)	Mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Sulfitos redutores (em 0,01g)
Urze		0	1,55×10 <sup>2</sup>	<10	<10	2,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
	20-25°C	2	1,73×10 <sup>2</sup>	<10	<10	4,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
		4	1,91×10 <sup>2</sup>	<10	<10	8,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
	45°C	2	1,36×10 <sup>2</sup>	<10	<10	4,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
		4	<10	<10	<10	6,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
	4°C	2	1,46×10 <sup>2</sup>	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
		4	1,36×10 <sup>2</sup>	<10	<10	<10	Ausente	Ausente

**Tabela 4** - Parâmetros microbiológicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico (Continuação).

Mel	Amostra	Tempo (meses)	Mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Sulfitos redutores (em 0,01g)
Cerejeira	20-25°C	0	<10	<10	<10	4,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
		2	<10	<10	<10	4,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
		4	<10	<10	<10	4,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
	45°C	2	1,91×10 <sup>2</sup>	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
		4	1,91×10 <sup>2</sup>	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
	4°C	2	<10	<10	<10	2,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
		4	<10	<10	<10	2,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente

**Tabela 4** - Parâmetros microbiológicos do mel aos 0, 2 e 4 meses de armazenamento à temperatura ambiente, na estufa a 45°C e no frigorífico (Continuação).

Mel	Amostra	Tempo (meses)	Mesófilos (UFC/g)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	Coliformes Totais (UFC/g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Sulfitos redutores (em 0,01g)
Castanheiro		0	2,32×10 <sup>2</sup>	7,91×10 <sup>3</sup>	<10	<10	Ausente	Ausente
	20-25°C	2	<10	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
		4	1,00×10 <sup>1</sup>	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
	45°C	2	<10	<10	<10	<10	Ausente	Ausente
		4	<10	<10	<10	2,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
	4°C	2	1,21×10 <sup>2</sup>	7,50×10 <sup>3</sup>	<10	6,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente
		4	<10	7,09×10 <sup>3</sup>	<10	2,00×10 <sup>1</sup>	Ausente	Ausente

A avaliação da qualidade microbiológica de um alimento fornece informações sobre as condições de processamento, armazenamento distribuição para o consumo, tempo de vida de prateleira e conseqüentemente o risco para a saúde pública (Franco e Lanfgraf, 1996). A legislação da UE carece de especificações relativas a contaminação microbiológica e higiene do mel. Os estudos de contaminação microbiológica são poucos e são, essencialmente, dedicados ao *Clostridium botulinum*.

Da análise da Tabela 4, verifica-se que o nível de contaminação por aeróbios mesófilos para os diferentes tipos de méis nas três condições de armazenamento variou entre  $<10$  e  $1,91 \times 10^2$  UFC/g. Os valores obtidos situaram-se abaixo do limite estabelecido pelo Regulamento Técnico Mercusol de Identidade e Qualidade do mel (MERCUSOL/GMC/RES nº. 15/94). A presença destes microrganismos tem relação direta com as condições gerais de colheita, temperatura e armazenamento do mel e é indesejável nos alimentos, pois provocam deterioração, originando características organolépticas indesejáveis e reduzindo a vida útil do produto (Franco e Lanfgraf, 1996).

A presença de bolores e leveduras em alimentos, como o mel, geralmente indicam contaminação microbiana devido à falta de higiene e limpeza do material de trabalho. O crescimento deste tipo de microrganismos pode conduzir a uma alteração nos valores nutricionais, produzindo, assim, um sabor e características sensoriais indesejáveis. A contagem de bolores e leveduras mostraram que todos os méis analisados tinham menos de  $1,00 \times 10^1$  UFC/g, isso indica a ausência de fermentações indesejáveis, à exceção do mel de castanheiro armazenado no frigorífico, que apresentou um valor máximo de  $7,09 \times 10^3$  UFC/g. Este valor encontra-se acima do limite estabelecido pelo Mercusol ( $1 \times 10^2$  UFC/g). O baixo pH e a temperatura de refrigeração favorecem o desenvolvimento de fungos (bolores e leveduras), os quais se podem tornar predominantes no produto, além de implicar uma redução da vida de prateleira do produto podem representar risco para a saúde do consumidor (Gois *et al.*, 2013), uma vez que determinados fungos têm a capacidade de produzir micotoxinas que se disseminam nos alimentos podendo causar intoxicações agudas ou crónicas. A presença de bolores e leveduras no mel de castanheiro pode ser devido à falta de procedimentos de higiene durante a colheita, embalagem e/ou armazenamento das amostras de mel. A ausência de crescimento de leveduras na maioria das amostras poderá ser atribuída ao baixo teor de humidade. Estes microrganismos também podem ser inibidos a temperaturas

acima dos 27°C (Vargas, 2006), fato que pode ter contribuído para a ausência de microrganismos nas amostras armazenadas a 45°C.

Os coliformes totais, *Escherichia coli* e *S. aureus* são indicadores da qualidade sanitária dos alimentos. A contagem de um número elevado destes microrganismos pode indicar processamento inadequado ou contaminação pós processamento; deficiência nos processos de limpeza, sanitização e tratamento térmico; e multiplicação durante o processamento ou armazenamento (Franco e Landgraf, 2005).

Os coliformes totais oscilaram entre  $<10$  e  $8,00 \times 10^1$  UFC/g para o mel de rosmaninho e urze,  $<10$  e  $4,00 \times 10^1$  UFC/g para o mel de cerejeira e entre  $<10$  e  $8,00 \times 10^1$  UFC/g para o mel de castanheiro.

O indicador de contaminação fecal, *E.coli*, estava ausente em todas as amostras em estudo sugerindo boas práticas de higiene ao longo do processamento do mel e das diferentes condições de armazenamento. Gomes *et al.* (2011) encontraram valores semelhantes aos obtidos neste trabalho ao analisar 73 amostras de mel orgânico do Noroeste de Portugal. Por outro lado, Iurlina e Fritz (2005) detetaram coliformes em uma das setenta amostras analisadas em mel Argentino.

Em relação ao *S. aureus*, estes microrganismos não se encontravam presentes nas amostras em estudo. Estes resultados indicam uma adequada manipulação do produto, sugerindo Boas Práticas de Higiene.

Os indicadores de segurança alimentar (clostrídios sulfito-redutores) estavam ausentes em todas as amostras analisadas sugerindo que se trata de produtos inócuos para os consumidores. Estes resultados foram inferiores aos valores obtidos por Finola *et al.* (2007) que detetaram a presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores em 70% das amostras de mel analisadas. Já Gomes *et al.* (2010), não detetaram a presença deste microrganismo ao analisarem cinco méis comerciais disponíveis no mercado Português. Também Estinho *et al.* (2012) verificaram ausência de clostrídios sulfito-redutores ao avaliarem a qualidade de 75 amostras de mel orgânico da região de Trás-os-Montes.

### 3.4. Identificação de leveduras

Nas amostras em estudo, apenas foi identificada uma espécie de levedura, a *Cândida glabrata* spp.

A *Cândida glabrata* é uma levedura saprófita da microbiota normal de indivíduos saudáveis (Tapia, 2008). Embora este microrganismo fosse considerado não patogénico, hoje em dia, é considerado um patogénico emergente. A taxa de mortalidade por *Cândida glabrata* spp é relativamente alta quando comparada com outras espécies de *Candida não albicans* (Tapia, 2008).

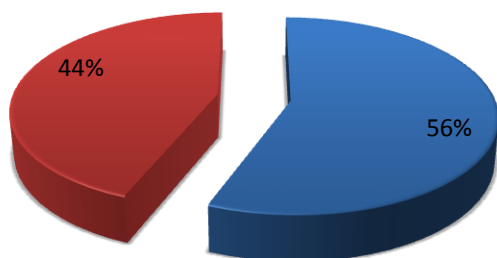
### 3.5. Análise sensorial

A análise sensorial foi somente realizada nas amostras de mel à temperatura ambiente, uma vez que as amostras a 45°C apresentaram um elevado teor de HMF ultrapassando os limites estabelecidos pela legislação. Por outro lado, também não se efectuou a análise nas amostras refrigeradas por estas se apresentarem cristalizadas, sendo necessário proceder à sua descristalização podendo ocorrer o aumento do HMF. Como referido anteriormente, o HMF está entre as substâncias de risco de citotoxicidade, genotoxicidade e atividade mutagénica.

Nesta secção, começamos por apresentar as características dos provadores.

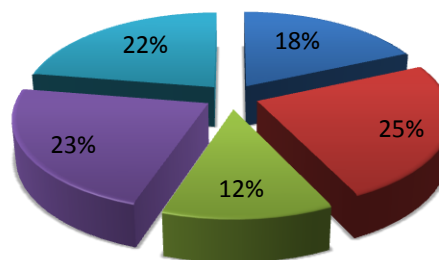
Os resultados apresentados na figura 11 mostram que dos 50 provadores que participaram no painel, 56% eram mulheres e 44% eram homens. A faixa etária dos provadores estava compreendida entre 18 e 56 anos de idade, em que 41% dos provadores eram naturais de Bragança.

Em relação aos hábitos de consumo de mel verificamos que, a sua frequência por ano foi de: 12% 12 vezes por ano, 18% menos que uma vez, 23% 3 a 4 vezes, 25% 1 a 2 vezes e 22% mais que 12 vezes por ano (figura 12).



■ Feminino ■ Masculino

**Figura 11** - Provedores por gênero.



■ Menos que 1 x/ano  
 ■ 1 a 2 x/ano  
 ■ 12 x/ano  
 ■ 3 a 4 x/ano  
 ■ Mais que 12x/ano

**Figura 12** - Frequência do consumo de mel.

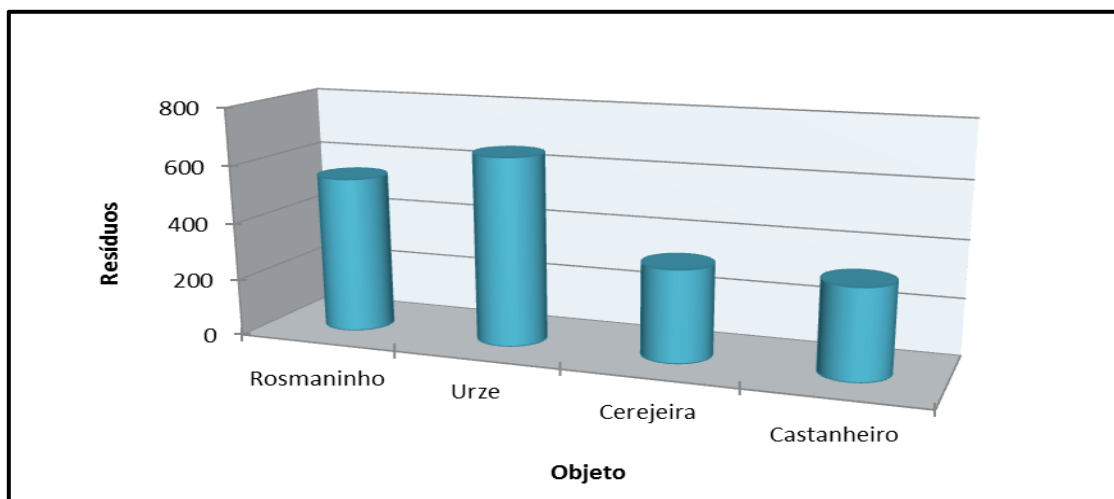
A Análise de Procrustes Generalizada (APG) é uma análise multivariada exploratória de dados, que permite minimizar os efeitos de escala utilizada pelos consumidores (50 configurações), obter uma configuração bi ou tridimensional consensual (ou configuração média) e detetar diferenças entre os objetos (tipos de mel) em estudo quanto aos atributos sensoriais, tais como a consistência, a cor, o aroma, o sabor e a apreciação global.

Na tabela 8 apresentam-se os resultados da análise de variância de Procrustes (PANOVA). Da análise da tabela, observa-se que o efeito da transformação de escala na redução da variabilidade das configurações ( $Pr > F$ ) não foi altamente significativo ( $P < 0,001$ ).

**Tabela 5-** Análise de variância de Procrustes (PANOVA).

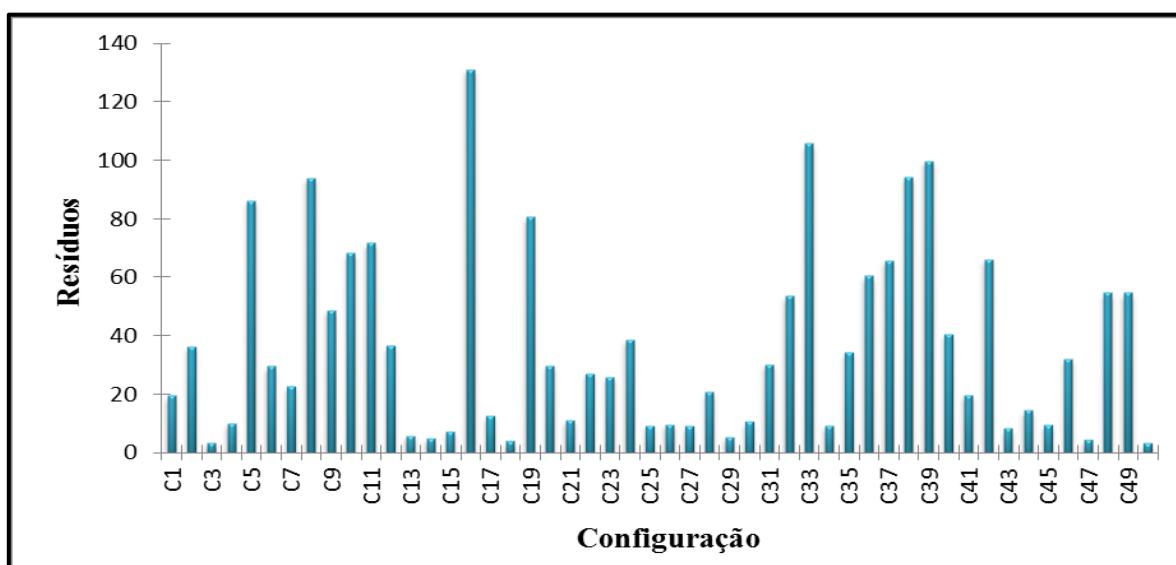
Fonte	GL	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	Pr > F
Resíduos após transformação de escala	686	2149,928	3,134		
Transformação de escala	49	39,217	0,800	0,255	1,000
Resíduos após translação	735	2189,145	2,978		
Translação	245	1543,755	6,301	2,011	< 0,001
Total corrigido	980	3732,900	3,809		

Na figura 13 observam-se os resíduos por objetos depois das transformações de APG. Verifica-se que o mel de castanheiro obteve o resíduo mais baixo (313,9), o que significa que este mel é o objeto de maior consenso. Por sua vez, o mel de urze apresentou o menor consenso entre os provadores, com o resíduo mais elevado (654,4).



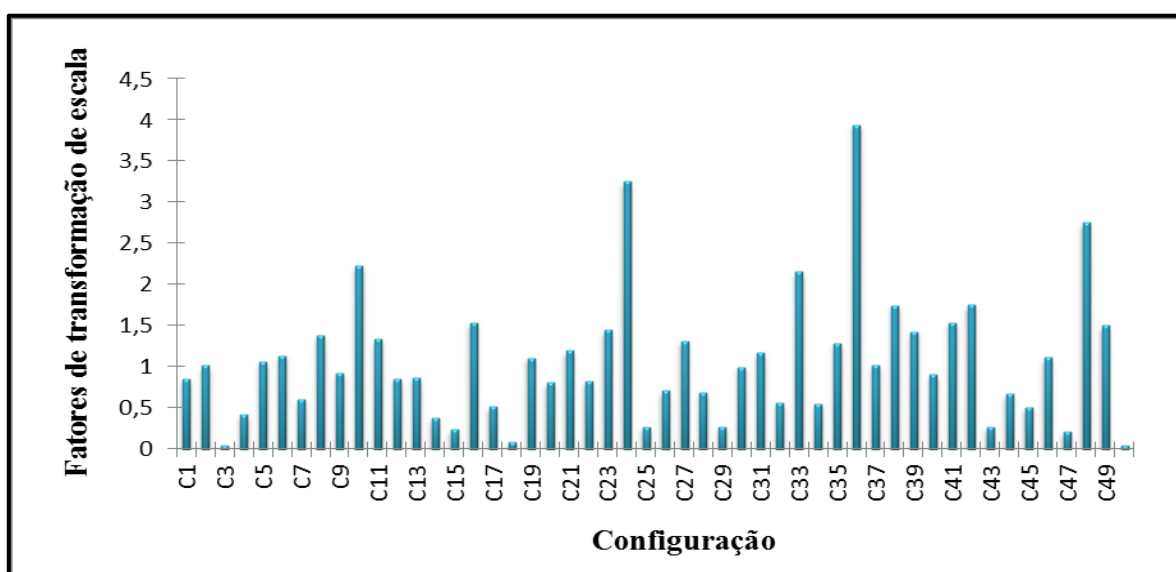
**Figura 13** - Resíduos por objecto.

Os resíduos por configuração depois das transformações de APG estão representados na figura 14. Observa-se que o resíduo referente ao provador 16 foi o mais elevado, o que indica que este provador foi o que se afastou mais do consenso, isto é os valores que atribuiu foram diferentes dos outros provadores.



**Figura 14** - Resíduos por configuração

Na figura 15 estão sumariados os fatores de transformação de escala para cada configuração. Um fator inferior a 1 indica que o provador correspondente não está a usar a escala tão largamente como os restantes. Um fator superior a 1 indica que o provador correspondente está a usar a escala mais largamente do que os outros. Pela análise do gráfico, verifica-se que 50% dos provadores usam a escala mais amplamente do que os restantes. Destes, o provador 24 e 36 foram os que mais se destacaram.

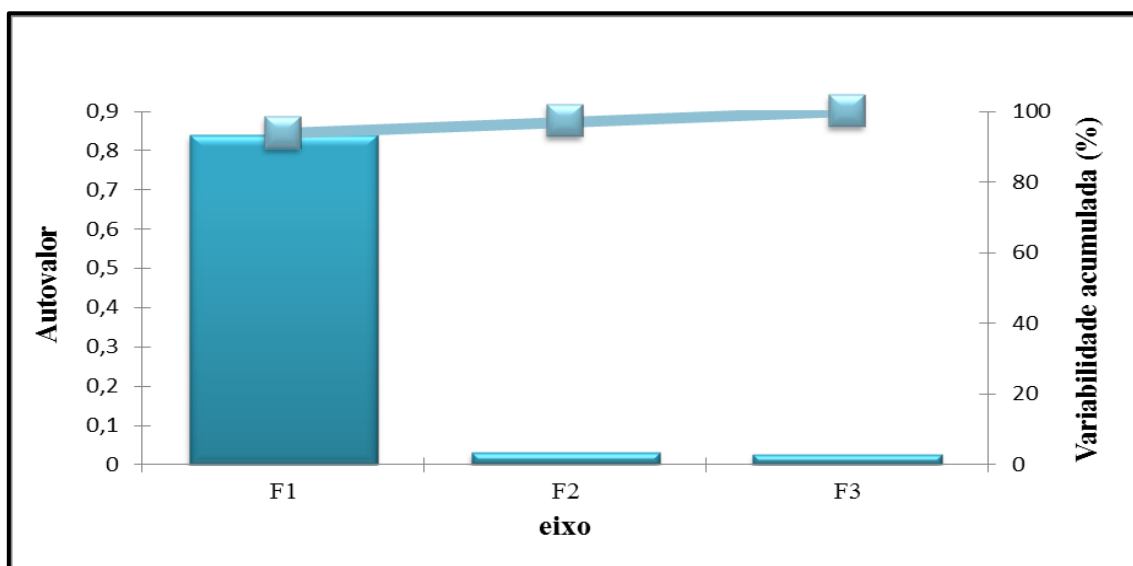


**Figura 15** - Fatores de transformação de escala para cada configuração.

Após a Análise Procrustiana, efectuou-se a análise de componentes principais (ACP) não normalizada, que permitiu aplicar uma transformação à configuração consensual de modo a obter uma representação óptima nos primeiros eixos. A transformação da ACP foi aplicada a cada configuração correspondente a cada provador.

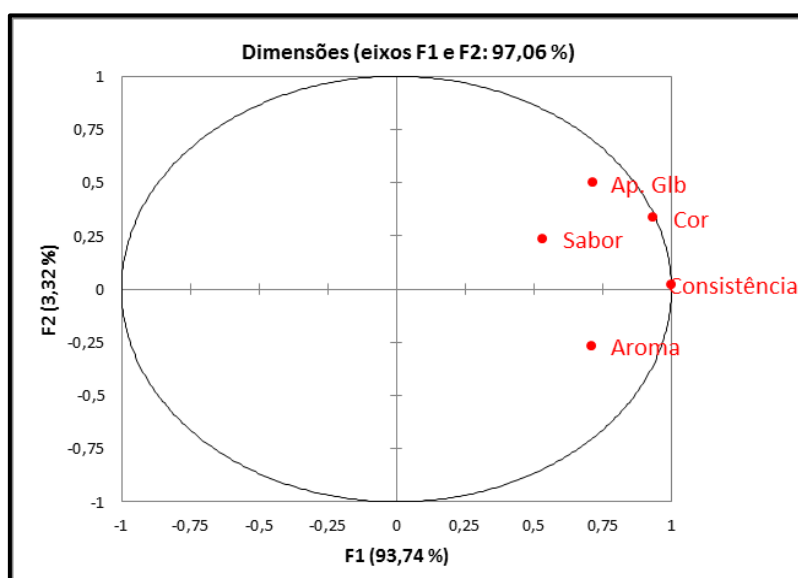
Seguidamente apresentam-se os resultados da análise de componentes principais (ACP).

Na Figura 16 estão representados os autovalores e a variabilidade acumulada por cada um dos fatores. Os autovalores indicam a proporção da variabilidade total representada em cada um dos eixos fatoriais. Verifica-se que 93,74% da variabilidade está representada na primeira dimensão, 3,32% na segunda e 2,94% na terceira dimensão.



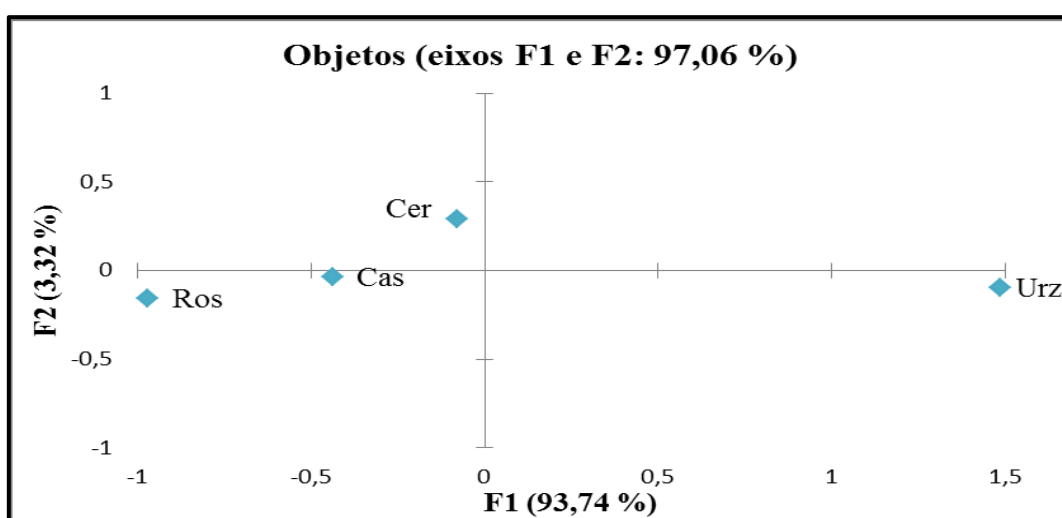
**Figura 16** - Autovalores e variabilidade acumulada por fator.

Na figura 17 ilustram-se as correlações entre as dimensões e os fatores 1 e 2. Verifica-se que todas as características estão alta e positivamente correlacionadas com a primeira dimensão (correlações situadas entre 0,53 para o sabor e 0,99 para a consistência). A cor, o sabor, a consistência e a apreciação global situam-se no primeiro quadrante (parte positiva do eixo cartesiano). O aroma situa-se no quarto quadrante.



**Figura 17** - Circulo das correlações entre as dimensões e os fatores.  
Ap.Glb.– Apreciação global

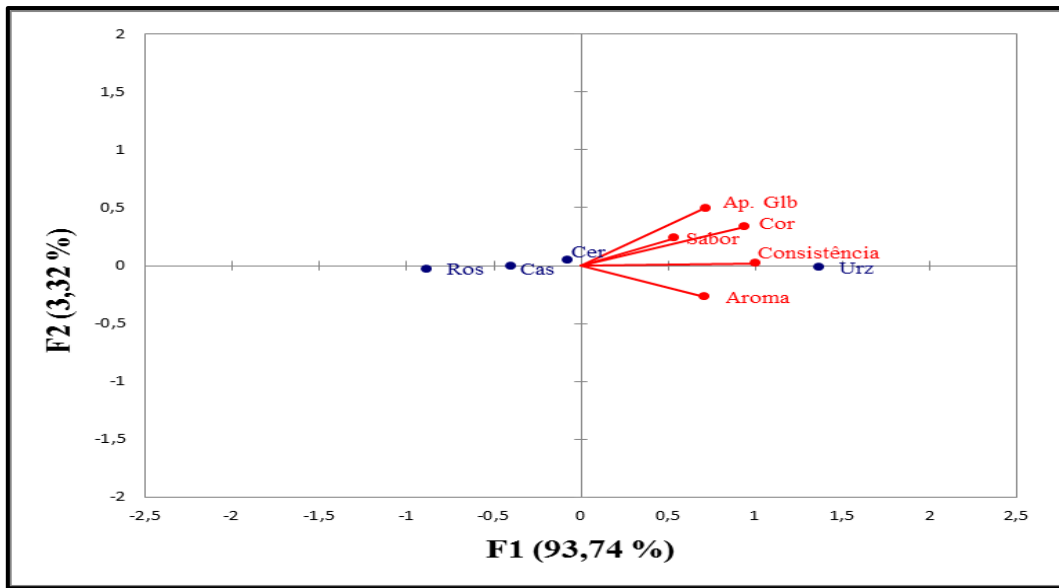
Na Figura 18 observam-se as coordenadas dos objetos após a análise de componentes principais (ACP). Verifica-se que o mel de cerejeira encontra-se na parte positiva do fator 2, enquanto os méis de rosmaninho, castanheiro e urze se encontram na parte negativa. Por outro lado, verifica-se que os méis de rosmaninho, castanheiro e cerejeira encontram-se na parte negativa do fator 1, enquanto o mel de urze se posicionou na parte positiva do mesmo fator, estando o mel de urze melhor posicionado na avaliação efetuada pelos provadores dos que os méis de rosmaninho, castanheiro e cerejeira, já que o fator 1 explicou 93,74% da variabilidade dos dados.



**Figura 18** - Coordenadas dos objectos após Análise das Componentes Principais (ACP).  
Ros – rosmaninho; Urz – urze; Cer – cerejeira; Cas – castanheiro.

Na figura 19 apresenta-se o mapa fatorial, segundo a configuração dos objectos (tipo de mel e as suas características sensoriais). Os pontos estão próximos do primeiro eixo cartesiano. A análise do gráfico sugere que o mel de urze apresentou valores mais elevados na escala de preferências no que diz respeito à apreciação global, cor, sabor e consistência e, valores intermédios quanto ao aroma.

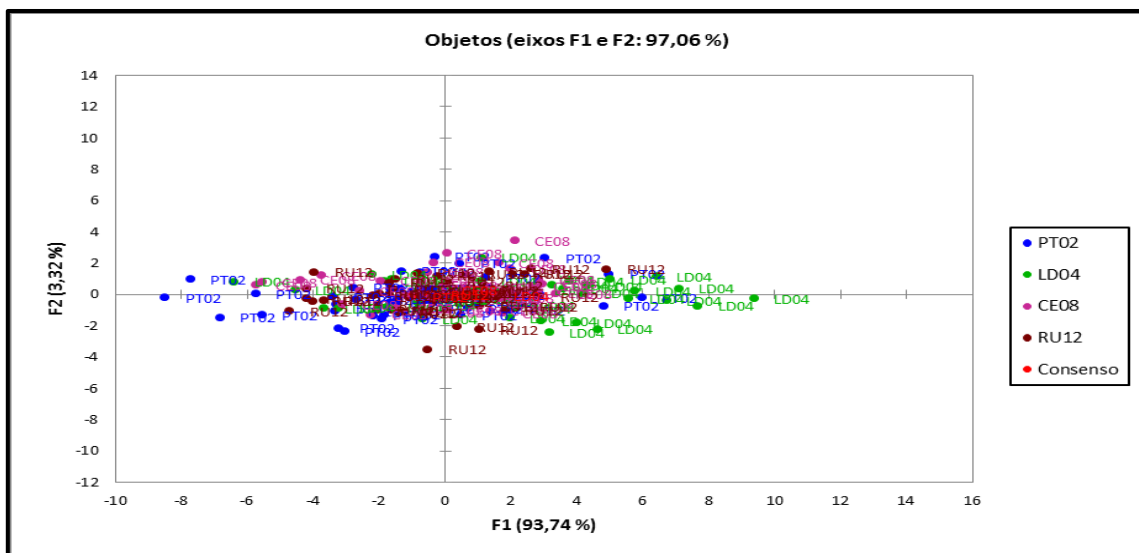
Os méis de rosmaninho, castanheiro e cerejeira foram aqueles a que os provadores atribuíram a pontuação mais baixa quanto à apreciação global, cor, sabor e consistência e, valores intermédios quanto ao aroma.



**Figura 19** - Coordenadas dos objectos após ACP.

Ap.Glb. – apreciação global; Ros – rosmaninho; Urz– urze; Cer- cerejeira; Cas – castanheiro.

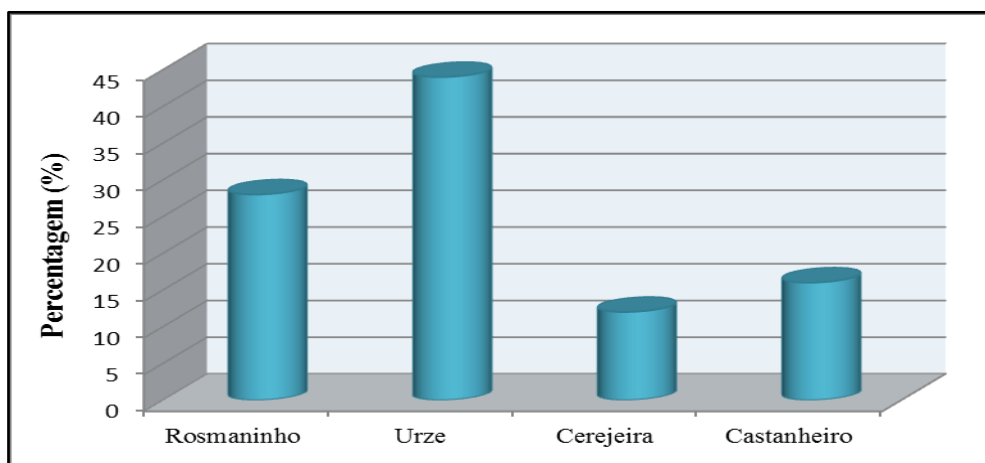
A figura 20 mostra o mapa de coordenadas dos objetos (tipos de mel) e dos provedores. Da análise da figura, verifica-se que apesar do consenso entre os provedores ter sido superior no mel de urze, a sobreposição dos grupos de méis foi elevada, sugerindo que os consumidores tiveram dificuldade em distinguir os diferentes tipos, especialmente o mel de rosmaninho, castanheiro e cerejeira.



**Figura 20** - Coordenadas dos objectos.

Ap. Glb. – apreciação global; PT02 – Rosmaninho; LD04 – urze; CE08 – cerejeira; RU12 – castanheiro.

Na ficha de avaliação onde constavam os atributos a estudar foi ainda pedido que os provadores dessem a sua opinião relativamente a qual das amostras comprariam. Os resultados obtidos estão representados na figura 21. O mel de urze foi aquele que obteve a maior preferência de compra, seguido pelo mel de rosmaninho, castanheiro e cerejeira, isto é, 44% dos provadores comprariam o mel de urze, 28% o mel de rosmaninho, 16% o mel de castanheiro e apenas 12% comprariam o mel de cerejeira.



**Figura 21** – Preferência de compra.

# Capítulo 4

*Considerações  
finais*



Com o presente trabalho pretendeu-se estudar o efeito da temperatura de armazenamento sobre os parâmetros físicos-químicos e microbiológicos de méis monoflorais, foi também analisado o perfil polínico e sensorial dos quatro méis de produção biológica.

As amostras de mel de produção biológica colhidas pelos apicultores em zonas distintas do concelho de Vimioso podem ser classificadas como mel monofloral de rosmaninho (*Lanvandula* sp), urze (*Erica* sp), cerejeira (*Prunus* sp) e castanheiro (*Castanea* sp).

As variações na composição físico-química do mel armazenado durante os 4 meses à temperatura ambiente e no frigorífico foram menos evidentes do que as produzidas a 45°C, embora alguns parâmetros sofressem perda ou aumento a baixas temperaturas sugerindo modificações químicas e físicas.

Os parâmetros físico-químicos podem ser úteis como indicadores de aquecimento ou armazenamento do mel a altas temperaturas, especialmente o HMF e o índice diastásico, no entanto a variação destes parâmetros durante o armazenamento a baixas temperatura foi menos evidente.

O armazenamento do mel no frigorífico foi eficaz na redução da velocidade de formação de HMF em relação à temperatura ambiente e, em especial à temperatura de 45°C, no entanto a refrigeração acelerou o processo de cristalização do produto.

Os indicadores de qualidade comercial, nomeadamente os microrganismos aeróbios mesófilos e os bolores e leveduras, situaram-se dentro dos limites estabelecidos pelo Regulamento Técnico Mercusol de Identidade e Qualidade do mel, à excepção do mel de castanheiro que ultrapassou os limites estabelecidos para os bolores e leveduras quando armazenado no frigorífico. A presença de bolores e leveduras acima dos limites pode ser atribuída principalmente à contaminação devido à má manipulação no momento de colheita, embalagem e armazenamento.

Quanto à qualidade sanitária (Coliformes totais, *E. coli*, e *S. aureus*) apenas foram detectados coliformes totais, em níveis reduzidos, sendo as amostras de mel de rosmaninho à temperatura ambiente e a 45°C os que apresentaram os menores valores.

Os indicadores de segurança (clostrídios sulfito-redutores) estavam ausentes em todas as amostras em estudo indicando que este produto é seguro para o consumidor.

Das leveduras isoladas apenas foi identificada uma espécie, a *Candida Glabrata* spp.

Por fim, na análise sensorial dos quatro méis de produção biológica constatou-se que os atributos que os consumidores conseguiram avaliar mais facilmente e cuja contribuição para a apreciação global foi mais acentuada foram a cor, o sabor e a consistência. O mel de urze foi o que apresentou valores mais elevados na escala de preferências. Relativamente à preferência de compra, os consumidores manifestaram maior preferência pelo mel de urze e menor pelo mel de cerejeira.

Podemos concluir, que os dados apresentados neste estudo mostram a importância de verificar as condições em que os méis são armazenados e conservados, de forma a garantir segurança para os consumidores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramovič, H., Jamnik, M., Burkan, L., Kac, M. (2008). Water activity and water content in Slovenian honeys. *Food Control*, **19**, 1086-1090.
- 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.
- Al, M.L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, **112**, 863-867.
- 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.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, **22**, 1041-1047.
- Almeida-Muradian, L., Stramm, K., Estevinho, L. (2013). Efficiency of the FT-IR ATR spectrometry for the prediction of the physicochemical characteristics of Melipona subnitida honey and study of the temperature's effect on those properties. *International Journal of Food Science and Technology*.
- Alonso-Torre, S.R., Cavia, M.M., Fernández-Muiño, M.A., Moreno, G., Huidobro, J.F., Sancho, M.T. (2006). Evolution of acid phosphatase activity of honeys from different climates. *Food Chemistry*, **97**, 750-755.
- Alvarez-Suarez, J., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E. e Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, **3**, 15-23.
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., González-Paramás, A.M., Damiani, E., Astolfi, P., Martínez-Sánchez, G., Bompadre, S., Quiles, J.L., Santos-Buelga, C., Battino, M.

- (2012a). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 1508-1516.
- Alves, E.M., Fonseca, A.A.O., Santos, P.C., Bitencourt, R.M., Sodré, G.S., Carvalho, C.A.L. (2012). Estabilidade físico-química e sensorial de méis desumidificado de *Tetragonisca angustula*. *Magistra, Cruz das Almas-BA*, 24, 185-193.
- Alves, M.R.F.A. (1994). Análise estatística multivariada no estudo dos resultados do controlo da qualidade sensorial de alimentos. Dissertação apresentada no concurso de provas públicas para a categoria de Professor Coordenador, na Área de Engenharia Alimentar – Controlo de qualidade. Escola Superior de Tecnologia e Gestão. Instituto Politécnico de Viana do Castelo, 453.
- Alves, P.L.S. (2009). Perfil Sensorial e instrumental de méis silvestres de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* sp.) das quatro mesorregiões do estado do Piauí. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Alves, R.M.O., Carvalho, C.A.L., Souza, B.A. (2006). Espectro polínico de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae). *Acta Scientiarum – Biological Sciences*, **28**, 65-70.
- Andrade, P., Ferreres, F. and Amaral, M.T., (1997a). Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **20** (14), 2281-2288.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, **63** (4), 549–562.
- 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.
- Anupama, D., Bhat, K.K., Sapna, V.K. (2003). Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Research International*, **36**, 183-191.
- AOAC Official Method 2005.03. Detection and confirmed quantitation of coliforms and *E. coli* in foods.
- Arnaud, A.F., Silva, R.A., Araújo, L.L.S., Júnior, R.J.S., Junior, DA. 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*

*Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA)*, **3**, 73-85.

Aroucha, E.M.M., Oliveira, A.J.F., Nunes, G.H.S., Maracajá P.B., (2008). Qualidade do mel de abelha produzidos pelos incubados da iagram e comercializado no Município de Mossoró/RN. *Caatinga*, Mossoró, **21** (1), 211-217.

Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-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.

Azeredo, L.C., Azeredo, M.A.A., Souza, S.R., Dutra, V.M.L. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, **80**, 249–254.

Azeredo, M.A.A., Azeredo, L.C., Damasceno, J.G. (1999). Características físico-químicas dos méis do município de São Fidelis-RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **19**, 3-7.

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.

Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S., Ananthanarayan, L. (2009). Optimization of *Aspergillus niger* Fermentation for the Production of Glucose Oxidase. *Food and Bioprocess Technology*, **2**, 344-352.

Baptista, P., Linhares, M. (2005). Higiene e Segurança Alimentar na Restauração. Vol. 1, 1ª ed. Forvisão – Consultadoria em Formação integrada. Guimarães, Portugal.

Barbosa, M. (2011). Avaliação da estabilidade de mel da mesma origem ao longo de 6 anos: comparação com mel comercializado. Dissertação de Mestrado apresentada na Faculdade de Ciências das Universidade do Porto.

- Bastos, D.H.M., Franco, M.R.B., Da Silva, M. A.A.P., Janzantti, 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.
- Bath, P.K., Singh, N. (2000). A research note chemical changes in *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey during storage. *Journal of Food Quality*, **23**, 443-451.
- Bertoldi, F.C., Reis, V.D.A.R., Gonzaga, L.V., Congro, C.R. (2007). Caracterização físico-química e sensorial de amostras de mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) produzidas no pantanal. *Evidência*, Joaçaba, **7**, 63-74.
- 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.
- Bianchi, E.M. (1990). Control de calidad de la miel y la cera, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y alimentación (FAO).
- Biedrzycki, A. (2008). Aplicação da Avaliação Sensorial no Controlo de Qualidade em um Indústria de Produtos Cárneos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos.
- Bogdanov, S. (1999). Honey quality and international regulatory standards: review by International Honey Commission. *Bee World*, **80**, 61-69.
- 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.
- Bulut, L., Kilic, M. (2009). Kinetics of Hydroxymethylfurfural, Accumulation and color change in honey during storage in relation to moisture content. *Journal of Food Processing and Preservation*, **33**, 22-32.
- Camargo, R.C.R., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Wolff, L.F. (2006). Mel: características e propriedades. Teresina: Embrapa Meio-Norte, **29**.

- Carvalho, C.A.L., Souza, B.A., Sodré, G.S., Marchini, L.C., Alves, R.M.O. (2005). Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química, *Série Meliponicultura*, 4.
- Castro-Vasquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., Fuente, E., Pérez-Coello, M.S. (2008). Influence of Storage Conditions on Chemical Composition and Sensory Properties of Citrus Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1999-2006.
- 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.
- Codex Stan 12-1981. Codex Standard for Honey, Rev 2 (Rev. 1987 and 2001), 11, 1-8.
- Costa, H.A.B. (2010). Cadeia de Frio e Segurança Alimentar – Controlo Estatístico da Temperatura. Dissertação apresentada na Universidade dos Açores.
- Costa, L., Albuquerque, M., Trugo, L., Quinteiro, L., Barth, O., Ribeiro, M., De Maria, C. (1999). Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry*, **65**, 347-352.
- Cotte, J.F., Casabianca, H., Giroud, B., Albert, M., Lheritier, J., Grenier-Loustalot, M.F. (2004). Characterization of honey amino acid profiles using high- pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**, 1342-1350.
- Crane, E. (1975). Honey: a comprehensive survey. London: Heinemann.
- Crane, E. (1983). O livro do mel. São Paulo: Nobel
- De Maria, C.A.B., Moreira, R.F. (2003). Compostos voláteis em méis florais. *Química Nova*, **26**, 990-996.
- Decreto-Lei n.º 214/2003, de 18 de Setembro. Diário da República Iª Série A.

- Downey, G., Hussey, K., Kelly, J.D., Walshe, T.F., Martin, P.G. (2005). Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chemistry*, **91**, 347–354.
- Eguía, P.B. (2001). El panel de catadores, In: Análisis sensorial de alimentos. Métodos e aplicaciones, Ibáñez, C., Barcina, E. (Ed). Springer, Barcelona, 73-85.
- 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.
- Escuredo, O., Silva, L.R., Valentão, P., Seijo, M.C., Andrade, P.B. (2012). Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chemistry*, **130**, 671-678.
- 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. (2011). Mel: microbiota e propriedades bioativas. *I Congresso Ibérico de Apicultura*, Livro de Resumos, Castelo Branco, Portugal.
- 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.
- EU. (2002). Council Directive 2001/110/CE concerning honey. Official Journal of the European Communities.
- Fallico, B., Arena, E., Verzera, A., Zappalà, M. (2006). The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation Quality Assurance*, **11**, 49-54.
- 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.
- Ferreira, C.M. (2008). Caracterização de Méis da Serra do Caramulo. Dissertação apresentada na Universidade de Aveiro.
- Ferreira, E.L., Lencioni, C., Benassi, M.T., Barth, M.O., Bastos, D.H.M. (2009). Descriptive sensory analysis and acceptance of singles bee honey. *Food Science and Technology International*, **15** (3), 251-258.

- Ferreira, E.L., Lencioni, C., Benassi, M.T., Barth, M.O., Bastos, D.H.M. (2009). Avaliação Sensorial de Mel de Abelhas Indígenas de Diferentes Localidades do Brasil. Acedido em: 5 de Setembro de 2013, disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/93/artigo3.htm>
- 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.
- Franco, B.D.G.M. (2008). Critérios microbiológicos para avaliação da qualidade de alimentos. In: Franco, B.D.G.M., Landgraf, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, **8**, 149-154.
- Franco, B.D.G.M., Landgraf, M., (2005). *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 195.
- Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. (1996). *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu., 181.
- Freitas, W.E.S., Aroucha, E.M.M., Soares, K.M.P., Mendes, F.I.B.M., Oliveira, V.R., Lucas, C.R., Santos, M.C.A. (2010). Parâmetros físico-químicos do mel de abelha sem ferrão (*Melipona subnitida*) após tratamento térmico. *Acta Veterinaria Brasilica*, **4** (3), 153-157.
- 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.
- Gomes, S., Dias, L.G., Moreira, L.L., Rodrigues, P., Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 544-548.
- Gomes, T., Féas, X., Iglesias, A., Estevinho, L. (2011). Study of organic Honey from the Northeast of Portugal. *Molecules*, **16**, 5374-5386.
- Gonzales, A.P., Burin, L., Buera, M.P. (1999). Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*, **32**, 185-191.

- González-Paramás A.M., Báñez, G.J.A., Marcos, C.C., García-Villanova, R.J., Sánchez, J.S. (2006). HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). *Food Chemistry*, **95**, 148-156.
- Grosso, G.S. (2006). Critérios relativos al análisis sensorial de mieles. *Apiservices-Galerie Virtuelle Apicole*, 1-14.
- Hermosín, I., Chicón, R.M., Cabezudo, M.D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, **83**, 263-268.
- Iglesias M.T., de Lorenzo C., Polo M.C., Martín-Álvarez, P.J., Puevo, E. (2004). Usefulness of amino acids composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of agricultural and food chemistry*, **52**, 84-89.
- Iglesias, A., Feás, X., Rodrigues, S., Seijas J.A., Vázquez-Tato M.P., Dias, L.G., Estevinho, L.M. (2012). Comprehensive study of honey with protected denomination of origin and contribution to the enhancement of legal specifications. *Molecules*, **17**, 856-8577.
- 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.
- Jiménez, M., Mateo, J.J., Huerta, T., Mateo, M. (1994). Influence of storage conditions on some physicochemical and mycological parameters of honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **64**, 67-74.
- Kaur-Bath, P., Narpinder, S. (2000). A research note chemical changes in *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey during storage. *Journal of Food Quality*, **23** (4), 443-451.
- Khalil, M.I., Moniruzzaman, M., Boukraâ, L., Benhanifia, M., Islam, Md.A., Islam, Md.N., Sulaiman, S.A., Gan, S.H. (2012). Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian Honey. *Molecules*, **17**, 11199-11215.
- Köster, E.P. (1998). L'organisation des épreuves hédoniques, In: Évaluation Sensorielle. Manuel méthodologique, 2e édition, SSHA (Ed). Collection Sciences et techniques agroalimentaires, Lavoisier TEC & DOC, Paris, 181-184.

- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, **100**, 526–534.
- Landívar, E.G. (2001). Bases psicofisiológicas del análisis sensorial: el gusto y el olfato, In: *Análisis sensorial de alimentos. Métodos e aplicaciones*. Ibáñez, C., Barcina, E. (Ed.). Springer. Barcelona, 14-47.
- Lengler, S. Inspeção e controle de qualidade do mel. Disponível em: [www.geocities.ws/apiarioflordomel/arqs/inspecao\\_mel01.doc](http://www.geocities.ws/apiarioflordomel/arqs/inspecao_mel01.doc). Acesso em: 3 de Setembro de 2013
- López, A.C., Alippi, A.M. (2009). Diversity of *Bacillus megaterium* isolates cultured from honeys. *Food Science and Technology*, **42**, 212-219.
- Louise, J.K., Durling, L.F.B, Björn, EH. (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 melissopalynology. *Bee World*, Bucks, **59**, 139-157.
- 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.
- Marchini, L.C., Moreti, A.C.C.C., Otsuk, I.P. (2005). Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no Estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **25** (1), 8-17.
- Martins, H.M., Martins, M.L., Bernardo, F.M.A. (2003). *Bacillaceae* spores, Fungi and aflatoxins determination in honey, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, **98**, 85-88.
- Melo, Z.F.N. (2002). Características físico-químicas de méis de abelha (*Apis mellifera* L.) em diferentes condições de armazenamento. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

- Melo, Z.F.N., Duarte., M.E.M., Mata, M.E.R.M.C. (2003). Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, **5** (1), 89-99.
- 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.
- Mercusol. (1999). Regulamento Técnico Mercusol “Identidade e Qualidade do mel”. Resolução GMC Nº 14/94, Montevideu.
- Migdal, W., Owczarczyka, H.B., Kedziab, B., Holderna-Kedzia, E., Madajczyk, D. (2000). Microbiological decontamination of natural honey by irradiation Radiation Physics and Chemistry, *Food Chemistry*, **57**, 285-288.
- Miller, M. W. (1979). Yeasts in food spoilage: an update. *Food Technology*, **33** (2),76-80.
- Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Programa apícola nacional triénio de 2011-2013, 2010; Acedido em 13 de Julho 2013, url: [http://www.gpp.pt/MA/apicultura/PAN\\_2011\\_13.pdf](http://www.gpp.pt/MA/apicultura/PAN_2011_13.pdf).
- 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 electrónica 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.
- Moura, S.G. (2006). Qualidade do mel de Abelhas (*Apis mellifera* L.) em função do ambiente e do tempo de armazenamento. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.
- Moura, S.G., Souza, D.C., Muratori, M.C.S., Alencar, L.C. (2011). Hidroximetilfurfural em méis de *Apis mellifera* Linneus (Apoidea:Apidae) armazenados à temperatura ambiente e sob refrigeração, Piauí-Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, **12** (4), 1077-1083.

- Murray, J.M., Delahunty, C.M., Baxter, I.A. (2001). Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International*, **34**, 461-471.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Poribio, L., Jiménez, J.J., Martín, M.T. (2001). High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal Chromatography A*, **917**, 95-103.
- NP ISO 11035 (1994) (E). Sensory analysis - Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach.
- NP ISO 8586-1 (2001). Norma Portuguesa. Análise sensorial. Guia geral para a seleção, treino e controlo dos provadores. - Parte 1: Provadores qualificados.
- NP-1829 (1982) - Microbiologia Alimentar - Preparação da amostra para análise microbiológica. Instituto Português de Qualidade (IPQ), Portugal.
- NP-2262 (1986) - Microbiologia Alimentar - Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal.
- NP-4400-1 (2002) - Microbiologia Alimentar. Regras gerais para contagem de *Staphylococcus aureus* e outras espécies. Parte 1: Técnica com confirmação de colónias (método corrente). IPQ, Portugal.
- NP-EN-1307 (1983) – Mel: definição, classificação, e características. 2ª Edição. Instituto Português da Qualidade (IPQ), Portugal.
- 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.
- Oliveira, P.S., Müller, R.C.S., Dantas, K.G.F., Alves, C.N. (2012). Ácidos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellífera* (Apidae, Apini) da Amazônia. *Química Nova*, **35** (9), 1728-1732.
- Paiva, C.A., Tomaz, H.V.Q., Aroucha, E.M.M., Nunes, H.S., Oliveira, A.J.F. (2012). Vida de prateleira do mel produzido por abelhas africanizadas. *Acta Veterinaria Brasilica*, **6** (2), 151-159.
- Paula, V.M.B. (2012). Caracterização química e biológica do própolis da “Serra de Bornes” por TLC. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para a obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar.

- Paulos, K.V.F. (2012). Qualidade sensorial de salsichas frescas de carne de ovinos e caprinos. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias da Ciência Animal, Bragança.
- Pavelková, A., Kačániová, M., Čuboň, J., Švecová, Z., Kňazovická, V., Felsöciová, S. (2013). Physicochemical and microbiological quality of honey from Liptov Region. *Journal of Microbiological, Biotechnology and Food Sciences*, **2**, 1185-1193.
- Pedraço, M. R., Coró, F.A.G. (1999). Análise sensorial e sua importância na pesquisa de alimentos. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, **1** (1), 85-89.
- Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Camargo, R.C.R., Vilela, S.L.O. (2003). Produção de mel. Embrapa Meio-Norte.
- Pereira, P.J.M.F. (2007). Propriedades antibacterianas do mel. Tese de licenciatura em Ciências da nutrição, Faculdade de ciências da nutrição e alimentação - Universidade do Porto, Porto.
- Perez, C., Conchello, P., Arino, A., Yanguela, J., Herrera, A. (1989). Dosage des acides aminés des protéines de différents miels espagnols. *Sciences des Aliments*, **9**, 203-207.
- Perez, R.A., Iglesias, M.T., Pueyo, E., Gonzalez, M., De Lorenzo, C. (2007). Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of agricultural and food chemistry*, **55**, 360-365.
- Pérez-Elortondo, F.J. (2001). Ensayos hedónicos, In: Análisis sensorial de alimentos. Métodos e aplicaciones, Ibáñez, C., Barcina, E. (Ed). Springer, Barcelona, 90-108.
- Persano Oddo, L., Piazza, M.G., Sabatini, A.G., Accorti M. (1995). Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, **26**, 453-465.
- Piana, M.L., Oddo, L.P., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., Declerck, C.G. (2004). Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, **35**, S36-S37.
- Pires, S.M.A., Rodrigues, T., Rocha, A., Fernandes, L., Pajuelo, A., Pereira, O. (2000). Contributo para a caracterização polínica do mel de Trás-os-Montes. In XIII Congresso Brasileiro de Apicultura "Polinização, Agricultura e Biodiversidade". Florianópolis, Brasil.
- Ragazani, A.V.F., Schoken-Iturrino, R.P., GarciaI, G.R., Delfino, T.P.C., Poiatti, M.L., Berchielli, S.P. (2008). Esporos de *Clostridium botulinum* em mel comercializado no Estado de São Paulo e em outros Estados brasileiros. *Ciência Rural*, **38**, 396-399.

- Rall, V.L., Bombo, A.J., Lopes, T.F., Carvalho, L.R., Silva, M.G. (2003). Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health?. *Anaerobe*, **9**, 299-303.
- Rodrigues, S. (2007). Estudo E Caracterização Da Qualidade Da Carcaça E Da Carne Do Cabrito Serrano (Denominação De Origem Protegida). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Rodríguez, G.O., Ferrer, B.S., Ferrer, A., Rodríguez, B. (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, **84**, 499–502.
- 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.
- Sanz, M.L., Gonzalez, M., De Lorenzo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (2005). A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry*, **91**, 313-317.
- Silva, C., Queiroz, A., Figueiredo, R. (2004). Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado de Piauí para diferentes floradas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **6**, 260-265.
- Silva, K.F.N.L., Santos, D.C., Silva, C.T.S., Queirós, A.J.M., Lima, A.O.N. (2010). Comportamento reológico do mel de *Apis mellifera* do Município de Tabuleiro do Norte – CE. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, **4**(1), 52-57.
- Silva, L.R., Videira, R., Monteiro, A.P., Valentão, P., Andrade, P.B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, **93**, 73-77.
- Silva, M.B.L., Chaves, J.B.P., Message, D., Gomes, J.C., Gonçalves, M.M., Oliveira, G.L. (2008). Qualidade microbiológica de méis produzidos por pequenos apicultores e de méis de entrepostos registrados no serviço de inspeção federal no estado de minas gerais. *Alimentação e Nutrição*, **19**, 417-420.
- Silva, R.A., Maia, G.A., Sousa, P.H.M. (2006). Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, **17**(1), 123-120.
- Silva, S.M.P.C., Carvalho, C.A.L., Estevinho, L.M., Sodré, G.N., Fonseca, A.A.O., Borges, J.A.C.P.B. (2012). Sensorial profile of *Apis mellifera* honeys produced by familiar farmers in Iguape Bay, Bahia, Brazil. *Magistra, Cruz das Almas-BA*, **24**, 172-178.

- Snowdon, J.A., (1999). The microbiology of honey-meeting your buyers' specifications (Why they do what they do). *American Bee Journal*, **1**, 51-60.
- Snowdon, J.A., Cliver, D.O., 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, **31**, 1-26.
- Snowdon, J.A., Cliver, J.O., 1995. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, **31**, 1-26.
- Sodré, G.S. (2005). Características Físico-Químicas, Microbiológicas e Polínicas de Amostras de Méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) dos Estados do Ceará. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.
- 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, J.M.B. (2011). Perfil Bromatológico de mel de abelha sem ferrão produzido na microrregião do Seridó do Rio Grande do Norte. Dissertação apresentada no Programa Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal do Paraíba.
- Souza, D.C., Bazlen, K. (1998). Análises preliminares de características físico-químicas de méis de Tiúba (*Melipona compressipes*) do Piauí. In: *XII Congresso Brasileiro de Apicultura*, Salvador, BA, 267.
- Spano, N., Casula, L., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Scanu, R. (2006). An RP HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey. *Talanta*, **68** (8), 1390-1395.
- 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. and Simal-Lozano, J. (2002a). Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **955**, 207-214.
- Tapia, P.C. (2008). *Candida glabrata*. *Revista Chilena Infectologia*, **25**(4), 293.
- Teixeira, L.V. (2009). Análise sensorial na indústria de alimentos. *Revista Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, **64**, 12-21.

- 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.
- Tho, K.A., Schmidt, F.L. (2011). Caracterização de diversos méis no Brasil. XIX Congresso interno de iniciação científica. UNICAMP. 2011.
- Tosi, E., Ciappini, M., Ré, E., Lucero. (2002). Honey thermal treatment effects on hidroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*, **77**, 71-74.
- Tosi, E.A., Ré, E., Lucero, H., Bulacio, L., 2004. Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *Lebensmittel.-Wissenschaft. und.-Technologie.*, **37**, 669-678.
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S., Velioglu, Y.S. (2006). Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, **95**, 653-657.
- UE, 2001. Council Directive 2001/110 relating to honey. *Official Journal of the European Communities*.
- 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.
- Villanueva, N.D.M. (2003). Avaliação do Desempenho de Quatro Métodos de Escalonamento em Testes Sensoriais de Aceitação Utilizando Modelos Normais Aditivos de Análise de Variância e Mapas Internos de Preferência. Campinas, 140. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos e Nutrição), Universidade de Campinas - UNICAMP.
- Vorlová, L., Celechovská, O. (2002). Activity of Enzymes and Trace Element Content in Bee Honey. *Acta Vet. Brno*, **71**, 375-378.
- Wang, X.H., Gheldof, N., Engeseth, N.J. (2004). Effect of Processing and Storage on Antioxidant Capacity of Honey. *Food Chemistry and Toxicology*, **69**(2).
- 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.
- White, J.W., Doner, L.W. (1980). Honey composition and properties. Beeking in the United States, *Agricultura handbook*, **335**, 82-91.

- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F., Ferreres, F., Martos, I., Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand Leptospermum honeys. *Food Chemistry*, **81**, 159-168.
- 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.
- Zappalà, M., Fallico, B., Arena, E., Verzera, A. (2005). Methods for determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*, **15**, 273.

# ANEXOS

## A. Reagentes utilizadas para a caracterização físico-química e polínica do mel

### 1. Solução alcoólica de fenolftaleína

Dissolveram-se 1g de fenolftaleína em 60mL de álcool e dilui-se em água até 100mL

### 2. Solução de Fehling A

Dissolveram-se 69,28g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) em água destilada e perpez-se o volume até 1L. Deixou-se repousar 1 dia antes de usar.

### 3. Solução de Fehling B

Dissolveram-se 346g de tartarato de sódio de potássio ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e 100g de hidróxido de sódio (NaOH) em água destilada, perpez-se o volume até 1L e filtrar.

### 4. Solução de azul metileno (0,2%)

Dissolveram-se 2g em água destilada e dilui-se até 1L.

### 5. Solução Carrez I

Dissolveram-se 15g de ferrocianeto de potássio trihidratado ( $\text{K}_4(\text{FeCN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) e dilui-se até 100mL com água destilada.

### 6. Solução Carrez II

Dissolveram-se 30g de acetato de zinco dihidratado ( $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e dilui-se até 100mL com água destilada.

### 7. Solução de bissulfito de sódio a 0,2% (Preparação diária)

Dissolveram-se 0,20g de bissulfito de sódio em água destilada e perpez-se o volume até 100mL.

### 8. Solução de bissulfito de sódio a 0,1% (Preparação diária)

Dissolveram-se 0,10g de bissulfito de sódio e perpez-se o volume até 100mL.

### **9. Solução stock de iodo**

Dissolveram-se 20g de iodeto de potássio (p.a.) em 30 a 40mL de água destilada. Adicionaram-se à solução anteriormente dissolvida 8,8g de iodo (p.a.) e dilui-se com água destilada até 1L.

### **10. Solução de iodo (0.0007N) (Validade de 48h)**

Dissolveram-se 20g de iodeto de potássio (p.a.) em 30 a 40mL de água destilada, num balão volumétrico de 500mL. Adicionaram-se 5mL de solução stock de iodo e completou-se até 500mL

### **11. Solução de iodo (0,02N) (solução diária)**

Dissolveram-se 20g de iodeto de potássio (p.a.) em 30 a 40mL de água destilada, num balão volumétrico de 500mL. Adicionaram-se 143mL de solução stock de iodo e completou-se até 500mL.

### **12. Tampão acetato, pH 5,3**

Num balão volumétrico de 500mL, dissolveram-se 87g de acetato de sódio trihidratado em 400mL de água destilada. Adicionaram-se 10,5mL de ácido glacial diluído (4.4) e adicionou-se água destilada até perfazer 500mL. Ajustou-se o pH a 5,3, se necessário, com acetato de sódio ou ácido acético.

### **13. Solução de cloreto de sódio 0.5M**

Dissolveram-se 14,5g de cloreto de sódio (p.a.) em água destilada e fez-se o volume até 500 mL. Solução com duração limitada pelo aparecimento de fungos.

### **14. Solução de amido para a determinação do índice de azul**

Num copo de 50 mL, dissolveram-se 1g de amido anidro em 45 mL de água destilada. Levou-se rapidamente à ebulição, em agitação, durante 3 minutos. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Depois de arrefecido, adicionaram-se 2,5 mL e tampão acetato. Transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL, colocou-se no banho-maria a 40°C e fez-se o volume com água destilada.

Adicionaram-se 75 mL de água destilada, 1 mL de ácido clorídrico, 1,5 mL de solução de iodo 0,02N, num balão volumétrico de 100 mL. Adicionaram-se também, 0,5

mL de cozimento de amido e perpez-se o volume com água destilada até aos 100 mL. Deixou-se repousar no escuro durante 1h. Leu-se a absorvância a 660 nm e comparou-se com a solução de referência de composição idêntica excepto a solução de amido.

O valor da absorvância deve estar compreendido 0,5 e 0,55, caso contrário é necessário ajustar a massa de amido anidro pesada. Este valor é igual ao valor de azul. Depois de determinar o índice de azul, efectuar o cozimento de amido. Para tal, num copo de 250 mL pesar o dobro de amido anidro determinado no procedimento anteriormente descrito e adicionar 90 mL de água destilada. Levar rapidamente à ebulição, sob agitação, durante 3 minutos. Cobrir com papel de alumínio e deixar arrefecer à temperatura ambiente. Transferir o conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL, colocar no banho-maria a 40°C até que a solução adquira esta temperatura e perfazer o volume com água destilada.

## **15. Glicerogelatina**

Pesaram-se 7 folhas de gelatina, cortadas em pedaços pequenos num copo de 100 mL. Adicionar 42 mL de água destilada e deixar repousar durante 2h. Em agitação, adicionar à gelatina 50g de glicerina concentrada e 0,5g de fenol. Aquecer a mistura durante 15 minutos e adicionar umas gotas de fucsina básica. Filtrar a solução através de lã de vidro e recolher o filtrado para uma placa de Petri.

### **15.1. Solução corante de fucsina básica**

Pesaram-se 0,5g de fucsina básica e dissolveram-se em 1 mL de etanol a 70%. Completou-se o volume de 150 mL com água destilada.

## **B. Meios de cultura utilizados na análise microbiológica do mel**

### **1. Água peptonada**

Pesaram-se 25,5g de água peptonada e dissolveram-se em 1L de água destilada. Autoclavou-se a 121°C durante 15 minutos.

## **2. Plate Count Agar (PCA) – Meio para pesquisa de microrganismos aeróbios mesófilos**

Triptona – 5g

Extrato de levedura – 2.50 g/L

Dextrose – 1.00 g/L

Agar – 15.00 g/L

Água – 1000 mL

pH final (25°C) – 7.0±0.2

Dissolveram-se 23.5g de meio em 1000ml de água destilada. Esterilizou-se na autoclave a uma pressão de 15lbs a 121°C durante 15 minutos. Após arrefecer e agitar, distribui-se aproximadamente 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixou-se arrefecer.

## **3. Potato Dextrose Agar (PDA) – Meio para pesquisa de bolores e leveduras**

Infusão de batata – 200.00 g/L

Dextrose – 20.00 g/L

Agar – 15.00 g/L

Água – 1L

pH final (25°C) – 5.6±0,2

Dissolveram-se 39g em 1000mL de água destilada. Ferveu-se até completa dissolução dos compostos do meio. Procedeu-se á esterilização na autoclave a uma pressão de 15 lbs a 121°C durante 15 minutos. Agitou-se, deixou-se arrefecer, adicionou-se 10mL de ácido tartárico e verteu-se nas placas.

## **4. Baird – Parker (BP) – Meio para pesquisa de Estafilococos coagulase positiva**

Triptona – 10.00g/L

Extrato de carne – 5.00g/L

Extrato de leveduras – 1.00g/L

Glicina – 12.00g/L

Piruvato de Sódio – 10.00g/L

Cloreto de Lítio – 5.00g/L

Agar – 20.00g/L

pH final (25°C) – 7.0 ±0.2

Suspendeu-se 63.0g de meio em 950ml de água destilada. Ferveu-se para dissolver completamente e esterilizou-se na autoclave a uma pressão de 15lbs a 121°C durante 15 minutos. Deixou-se arrefecer até aos 50°C e, assepticamente, foram adicionados 50mL de emulsão de gema de ovo (FD045).

## **5. TSN Agar - Meio para pesquisa de Clostrídios sulfito redutores**

Agar - 30g

Solução de Sulfato de Ferro a 8% - 10mL

Solução de Glicose Sulfito – 150mL

Solução de Sulfato de Sódio a 8% - 20mL

Alúmen de Ferro – 20 gotas

Água Destilada – 1000mL

Dissolveram-se os 30g de Agar e os 10mL de solução de sulfato de ferro num litro de água destilada e ferver. Após entrar em ebulição adicionaram-se 150mL de solução de glicose sulfito, previamente preparada. Ao meio fundido juntou-se 20mL da solução de sulfato de sódio e 20 gotas de alúmen de ferro.

### **5.1. Solução de sulfato de ferro a 8%**

Sulfato de Ferro – 8g

Água Destilada – 100mL

Dissolveram-se 8g de sulfato de ferro em 100mL de água destilada.

### **5.2. Solução de sulfato de sódio a 8%**

Sulfato de Sódio – 8g

Água destilada – 100mL

Dissolveram-se 8g de sulfato de sódio em 100mL de água destilada.

### **5.3. Solução de glicose sulfito**

Sulfito de Sódio – 40g

Glicose – 20g

Água Destilada – 500mL

Dissolveram-se 40g de sulfito de sódio em 200mL de água e os 20g de glicose aos 100mL de água restante. Ferveu-se ambas as soluções e depois misturou-se e agitou-se bem.

### C. Ficha de avaliação sensorial usada pelo painel de consumidores

DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_ SEXO: FEMININO MASCULINO IDADE: \_\_\_\_\_

NATURALIDADE: \_\_\_\_\_

FREQUÊNCIA DO CONSUMO DE MEL:

MAIS QUE 12X/ANO: \_\_\_ 12X/ANO: \_\_\_ 3 A 4X/ANO: \_\_\_ 1 A 2X/ANO: \_\_\_ MENOS QUE 1X/ANO: \_\_\_

Avalie cada amostra e marque com um círculo o valor que considere mais apropriado.

Amostra:	M <sup>to</sup> Desagradável				Médio				M <sup>to</sup> Agradável
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text" value="PT02"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text" value="LD04"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text" value="CE08"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text" value="RU12"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Amostra:	M <sup>to</sup> Desagradável				Médio				M <sup>to</sup> Agradável
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text" value="PT02"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text" value="LD04"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text" value="CE08"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="text" value="RU12"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9

<b>Aroma</b>	M <sup>to</sup> Desagradável				Médio				M <sup>to</sup> Agradável	
Amostra:										
<input type="text" value="PT02"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="LD04"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="CE08"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="RU12"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

<b>Sabor</b>	M <sup>to</sup> Desagradável				Médio				M <sup>to</sup> Agradável	
Amostra:										
<input type="text" value="PT02"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="LD04"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="CE08"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="RU12"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

<b>Apreciação Global</b>	M <sup>to</sup> Mau				Médio				M <sup>to</sup> Bom	
Amostra:										
<input type="text" value="PT02"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="LD04"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="CE08"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<input type="text" value="RU12"/>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

Qual destes méis comprava?

Amostra: \_\_\_\_\_

**OBRIGADO PELA COLABORAÇÃO**