

## **Caracterização de méis comerciais rotulados com a designação de mel de urze**

**Elsa Marisa Silva Caveiro**

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

Orientado por  
**Soraia Isabel Domingues Marcos Falcão**  
**Vitor Manuel Ramalheira Martins**

**Bragança  
2017**







## **Agradecimentos**

Com a elaboração deste trabalho, posso dizer que mais uma grande etapa da minha vida ficou concluída. Quero agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para que este sonho se tornasse real. Assim, agradeço aos meus pais e irmãs, pela força transmitida e incentivo, por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui, pois sem eles não poderia concretizar este meu objetivo MESTRADO.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Professor Doutor Miguel Vilas Boas, por me ter arrastado para esta grande escola, esta grande instituição (IPB), por todo o conhecimento que me transmitiu, pela paciência, dedicação, disponibilidade permanente, apoio, conselhos, pela amizade e boa disposição. Um muito obrigado, pelo tema que me propôs desenvolver, que me fez interessar pelo mundo das abelhinhas, pela essência do mel que de certa forma desconhecia, embora as abelhas não sejam as minhas melhores amigas. Um muitíssimo obrigado!

Quero também agradecer à minha orientadora Doutora Soraia Falcão pelos sábios conselhos e sugestões, pela paciência e pelo apoio prestado em todos os momentos de orientação deste trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador professor Doutor Vitor Martins, por todo o seu empenho, profissionalismo, compreensão, paciência e apoio demonstrado ao longo deste trabalho.

Agradeço também à minha querida colega Andreia Tomás pela disponibilidade demonstrada no laboratório e pela transmissão de conhecimentos, pelo companheirismo, ajuda, orientação, paciência, conselhos, ânimo, boa disposição, amizade e compreensão demonstrada ao longo do decorrer do trabalho. Um muito obrigado!

Quero agradecer aos docentes do Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, da Escola Superior Agrária de Bragança, o meu muito obrigado pelos saberes que me foram transmitidos ao longo destes anos e pelo empurrão que me deram para que esta etapa fosse concretizada. Ás Associações e Cooperativas de Produtores de mel que me forneceram as amostras para que este trabalho fosse realizado e ao Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciência da Universidade de Vigo, em Ourense.

A toda equipa de laboratório de LQBA que sempre se disponibilizaram para auxiliar no que fosse necessário, por me terem integrado e pelos conhecimentos que me transmitiram. Agradeço também ao Srº José Silva e Srº Carlos Sendas pela paciência, preciosa compreensão e ajuda que me deram para que pudesse terminar esta etapa.

É com grande satisfação e orgulho que agradeço a todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. A todos que, de qualquer forma, me apoiaram, ajudaram, incentivaram e acompanharam durante estes últimos anos neste percurso e que não se encontram aqui mencionados. Um muito obrigado pela amizade.

***“Temos que ser fiéis aos nossos planos. Não existem atalhos!!”***

Michael Jordan

## Resumo

O mel de urze, proveniente da floração de urzes (*Erica* sp.), é um produto apícola característico das terras altas e montanhosas de Portugal. A procura de méis monoflorais, devido às suas características particulares de sabor, aroma e propriedades biológicas, tem vindo a aumentar, tendo estes méis um maior valor comercial. Devido a este reconhecimento, estes méis apresentam uma maior susceptibilidade a adulterações através da rotulagem e também através da mistura de outros méis de qualidade inferior. Este trabalho teve como objetivo o estudo da composição e valor nutricional de méis comerciais de urze (*Erica* sp.), contribuindo deste modo para a caracterização e valorização deste produto.

Durante este estudo foram estudadas 12 amostras de mel de urze provenientes de sete áreas geográficas distintas de Portugal, tendo-se procedido à respetiva análise melissopalinológica e avaliação de diversos parâmetros físico-químicos (cor, humidade, pH, acidez, condutividade, índice diastásico e teor em prolina, 5-hidroximetilsfurfural (5-HMF) e compostos fenólicos totais), para além dos perfis em açúcares, compostos fenólicos e compostos voláteis. Foi ainda avaliada a composição nutricional, a atividade antioxidante (poder redutor e bloqueador de radicais livres) e as características reológicas das várias amostras de mel.

A análise melissopalinológica evidenciou a presença de 43 tipos de grãos de pólen, sendo os pólenes de urze (*Erica* sp), *Castanea sativa* e *Rubus* os maioritários, não se tendo identificado elementos de melada, o que permite concluir que se tratam de méis de néctar. As amostras A8 (região da Lousã), A11 e A10 (região de Boticas) foram classificadas como méis monoflorais de urze, as amostras A1 (região de Chaves) e A4 (região de Aguiar da Beira) como méis monoflorais de castanheiro e as amostras A3 (região de Aguiar da Beira), A6 (região de Boticas) e A7 (região de Palmela) como méis multiflorais. As amostras Ac, A2, A5 e A9 apresentaram percentagens de pólen de urze muito próximas do limite que é estabelecido para serem considerados méis monoflorais de urze.

Os méis estudados apresentaram valores de pH compreendidos entre 3,8 e 4,5, uma cor que variou entre o âmbar claro e o âmbar escuro e um comportamento de escoamento

maioritariamente Newtoniano, às diferentes temperaturas estudadas (25, 35 e 45 °C). De uma forma geral, as amostras de mel apresentaram teores de umidade, acidez livre, 5-HMF, prolina e valores de índice diastásico dentro dos limites estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 214/2003, de 18 de setembro, sugerindo uma extração do mel com um adequado grau de maturação. Apenas a amostra A6 apresentou um teor de 5-HMF superior ao estipulado na legislação, apesar de apresentar um valor de índice diastásico que está de acordo com a mesma, sugerindo a possível utilização de algum tratamento térmico ou método de conservação menos adequado.

A análise do perfil em açúcares, efetuada por recurso à técnica de cromatografia líquida de alta pressão com deteção por índice de refração (HPLC-RI), revelou a presença de frutose e de glucose como compostos maioritários e que no total perfizeram mais de 60% dos açúcares detetados. Foram ainda detetados em menor proporção outros açúcares, como erlose e melizitose nas amostras A1 (região de Chaves) e A3 (região de Aguiar da Beira) e que deixam em aberto a possibilidade destes méis apresentarem vestígios de melada, embora não tenham sido detetados elementos de melada através da análise melissopalinológica. Relativamente ao perfil em compostos fenólicos foi possível identificar vinte e sete compostos fenólicos (doze ácidos fenólicos e quinze flavonóides), para além de dois compostos isoprenóides (isómeros do ácido abscísico). As amostras de mel monofloral de urze apresentaram uma maior quantidade de ácidos fenólicos relativamente aos compostos da classe dos flavonóides. No entanto, os compostos mais abundantes foram os isómeros do ácido abscísico, considerados como indicadores de origem botânica para o mel de urze, e que foram detetados em todas as amostras, à exceção da amostra A1. Através da extração dos compostos voláteis por micro-extração em fase sólida (SPME) e respetiva análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) foi possível detetar cinquenta e nove compostos pertencentes a várias famílias químicas, sendo os terpenos hotrienol e o óxido de *cis*-linalol, e também o aldeído nonanal os compostos detetados em maior proporção, em termos de percentagem de área relativa.

## Abstract

Heather honey, from the heather bloom (*Erica* sp.), is a bee product typical of the highland regions of Portugal. Due to their particular flavor, taste, and biological properties, monofloral honeys are highly demanded by the consumer, increasing its commercial value. Because of that, monofloral honeys became more susceptible to be adulterated through incorrect labeling and fraudulent admixing with other low quality honeys. The aim of the present work was to analyze the physicochemical properties and nutritional composition of heather honey (*Erica* sp.), in order to increase the knowledge about heather honey and valorize this product.

During this work, 12 heather honey samples from seven different geographic areas of Portugal were studied. Melissopalynological and physicochemical analysis (color, moisture, pH, acidity, conductivity, diastase index, proline, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), and total phenolic compounds contents) were performed, as well as the evaluation of the sugar, phenolic and volatile profiles. Nutritional composition, antioxidant activity (reducing power and DPPH free radical scavenging activity), and rheological characteristics were also evaluated.

The melissopalynological analysis showed the presence of 43 types of pollen grains, with heather (*Erica* sp), *Castanea sativa* and *Rubus* pollens as the most abundant. Furthermore, since no honeydew elements were detected, all the analyzed samples were classified as nectar honeys. Samples A8 (Lousã region), A11, and A10 (Boticas region) were classified as heather monofloral honeys; samples A1 (Chaves region) and A4 (Aguiar da Beira region) as chestnut monofloral honeys, and A3 (Aguiar da Beira region), A6 (Boticas region), and A7 (Palmela region) as multifloral honeys. Ac, A2, A5 and A9 samples showed percentages of heather pollen very close to the limit established for heather monofloral honeys.

The honeys studied showed pH values between 3.8 and 4.5, a color ranging from light amber to dark amber, and most exhibited a Newtonian flow behavior at different temperatures (25, 35 and 45 °C). Generally, honey samples presented values of moisture, free acidity, 5-HMF, proline content, and diastase index within the limits established by Decreto-Lei nº. 214/2003, from 18<sup>th</sup> September, suggesting that the honey was extracted

at a correct ripeness level. Although exhibiting a normal diastase index, the A6 sample presented a 5-HMF value higher than the admitted in the legislation, suggesting that less adequate heat treatments and/or conservation methods might have been employed.

The sugar profile, analyzed by high pressure liquid chromatography with refractive index detection (HPLC-RI), showed that fructose and glucose were the most abundant compounds, representing more than 60% of total sugars. Other sugars, such as erlose and melizitose, were also detected in a lower proportion in the samples A1 (Chaves region) and A3 (Aguiar da Beira region). This suggests that these honeys may contain some honeydew vestiges, although not identified in the melissopalynological analysis. Regarding the phenolic profile, twenty-seven phenolic compounds (twelve phenolic acids and fifteen flavonoids) and two isoprenoid compounds (isomers of abscisic acid) were identified. Heather monofloral honey samples showed a higher amount of phenolic acids than flavonoids. However, the most abundant compounds were the isomers of abscisic acid, which are considered botanical origin markers for heather honey, and were detected in all samples, except for A1. Solid-phase microextraction (SPME) of the volatile compounds and subsequent analysis using gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS) technique allowed to detect 59 compounds of several chemical families. Terpenes hotrienol and *cis*-linalool oxide, together with the aldehyde nonanal, were the compounds detected in higher amounts, expressed as relative percentage areas.

# Índice geral

<b>Agradecimentos</b> .....	v
<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Índice de figuras</b> .....	xv
<b>Índice de tabelas</b> .....	xvii
<b>Abreviaturas e símbolos</b> .....	xviii

## Capítulo I - Introdução

1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos .....	1
2. Produtos apícolas.....	2
2.1. Pólen .....	3
2.2. Cera.....	4
2.3. Própolis .....	4
2.4. Veneno da abelha -Apitoxina.....	5
2.5. Geléia real .....	6
2.6. Mel .....	7
2.6.1. Classificação do mel.....	7
2.6.2. Origem botânica .....	8
2.6.3. Parâmetros de qualidade do mel.....	9
2.6.4. Propriedades organoléticas .....	11
2.6.4.1. Cor .....	11
2.6.4.2. Aroma e sabor.....	12
2.6.5. Parâmetros físico-químicos .....	12
2.6.5.1. Açúcares .....	13

2.6.5.2.	pH, acidez livre, acidez lactónica e acidez total.....	14
2.6.5.3.	Humidade .....	14
2.6.5.4.	Teor em cinzas e condutividade .....	15
2.6.6.	Parâmetros nutricionais .....	15
2.6.6.1.	Compostos azotados.....	15
2.6.6.2.	Vitaminas .....	16
2.6.7.	Caracterização bioquímica .....	16
2.6.7.1.	5-Hidroximetilfurfural e índice diastásico .....	16
2.6.8.	Compostos fenólicos .....	18
2.6.9.	Compostos voláteis.....	19
2.6.10.	Caracterização reológica.....	20
2.6.11.	Mel: alimento e saúde.....	22
2.7.	Mel de urze .....	23

## **Capítulo II – Material e métodos**

3.	Material e métodos .....	25
3.1.	Amostragem.....	25
3.2.	Análise do mel .....	26
3.2.1.	Análise polínica .....	26
3.2.2.	Cor .....	26
3.2.3.	Humidade .....	27
3.2.4.	Condutividade.....	27
3.2.5.	Cinzas .....	27
3.2.6.	pH, acidez livre e acidez lactónica .....	28
3.2.7.	Prolina.....	28
3.2.8.	Açúcares .....	29
3.2.9.	5-Hidroximetilfurfural .....	30
3.2.10.	Índice diastásico .....	31
3.2.11.	Parâmetros nutricionais .....	31
3.2.11.1.	Proteínas .....	31
3.2.11.2.	Hidratos de carbono .....	32

3.2.11.3. Energia .....	32
3.2.12. Conteúdo em fenóis totais .....	32
3.2.13. Atividade antioxidante.....	33
3.2.13.1. Efeito bloqueador de radicais livres DPPH.....	33
3.2.13.2. Poder redutor .....	34
3.2.14. Compostos fenólicos .....	34
3.2.14.1. Extração.....	34
3.2.14.2. Análise por UPLC/DAD/ESI-MS <sup>n</sup> .....	35
3.2.15. Análise de compostos voláteis.....	36
3.2.15.1. Microextração em fase sólida (SPME).....	36
3.2.15.2. Análise cromatográfica por GC-MS .....	37
3.2.16. Caracterização reológica.....	37
3.2.16.1. Viscosidade .....	37
3.2.16.2. Textura .....	38

### **Capítulo III – Resultados e discussão**

4. Parâmetros de avaliação da qualidade do mel.....	40
4.1. Análise polínica .....	40
4.2. Caracterização físico-química.....	43
4.2.1. Cor .....	43
4.2.2. Humidade .....	44
4.2.3. Condutividade elétrica .....	45
4.2.4. pH e acidez .....	45
4.2.5. 5-Hidroximetilfurfural .....	47
4.2.6. Índice diastásico .....	49
4.2.7. Prolina.....	49
4.2.8. Perfil de açúcares.....	50
4.3. Parâmetros nutricionais.....	54
4.4. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante .....	55
4.4.1. Compostos fenólicos totais.....	56
4.4.2. Poder redutor .....	57

4.4.3. Efeito bloqueador de radicais livres .....	57
4.5. Perfil de compostos fenólicos .....	58
4.6. Compostos voláteis .....	64
4.7. Propriedades reológicas .....	68
4.7.1. Viscosidade.....	68
4.7.2. Textura.....	70

#### **Capítulo IV – Conclusão e perspetivas de trabalho**

Conclusão .....	74
Perspetivas de trabalho .....	78

#### **Capítulo V – Referências bibliográficas**

Referências Bibliográficas.....	80
---------------------------------	----

#### **Capítulo VI - Anexos**

Anexos.....	96
-------------	----

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Pólen de abelha .....	3
<b>Figura 2</b> - Cera de abelha.....	4
<b>Figura 3</b> – Própolis. ....	5
<b>Figura 4</b> - Geléia real [15]. .....	6
<b>Figura 5</b> - Méis monoflorais em Portugal [25].....	9
<b>Figura 6</b> - Estrutura geral dos compostos fenólicos mais comuns encontrados no mel: a) - ácido hidroxibenzóico (ácido <i>p</i> -hidroxibenzóicos, R1=H, R2=H); b) – ácido hidroxicinâmico (ácido <i>p</i> -cumárico, R1=H; ácido cafeico, R1=OH); c) estrutura geral de um flavonóide. ....	18
<b>Figura 7</b> - Estrutura do ácido elágico. ....	19
<b>Figura 8</b> -Modelo de gráfico obtido pelo reómetro. ....	21
<b>Figura 9</b> - Abelha recolhendo néctar de <i>Erica australis</i> (urze vermelha). ....	23
<b>Figura 10</b> - Origem geográfica das amostras de mel [93]. .....	25
<b>Figura 11</b> - Medidor de condutividade. ....	27
<b>Figura 12</b> - Medidor de acidez.....	28
<b>Figura 13</b> - Equipamento de UHPLC/DAD/ESI-MS <sup>n</sup> .....	35
<b>Figura 14</b> - Extração de compostos voláteis por SPME. ....	36
<b>Figura 15</b> - Texturómetro. ....	38
<b>Figura 16</b> - Identificação polínica da amostra A2 : (a) <i>Erica umbellata</i> ; (b) <i>Erica arborea</i> ; (c) <i>Castanea sativa</i> ; (d) <i>Rubus</i> ; (e) <i>Cytisus</i> ; (f) <i>Crataegus</i> . ....	41
<b>Figura 17</b> - Cromatograma referente à análise do perfil de açúcares por HPLC-RI. da amostra Ac.....	51
<b>Figura 18</b> - Perfil fenólico, obtido por UPLC/DAD/ESI-MS <sup>n</sup> , do extrato de mel referente nesta amostra Ac, a 280 nm (os números na figura representam os compostos fenólicos identificados na amostra, <b>Tabela XIII</b> ).....	58
<b>Figura 19</b> - Viscosidade em função da velocidade de rotação do do <i>spindle</i> do viscosímetro para a amostra de mel A7, ensaiada às temperaturas de (25°C, 35°C e 45°C).....	69

<b>Figura 20</b> - Variação da viscosidade em função do tempo, para as amostras de mel A3 e A5, ensaiadas à temperatura de 25°C e 35°C.....	70
<b>Figura 21</b> - Traçado típico fornecido pelo reómetro durante um ensaio de extrusão de retorno ( <i>back extrusion</i> ).....	70

## Índice de tabelas

<b>Tabela I</b> - Parâmetros de qualidade do mel .....	10
<b>Tabela II</b> - Classificação das cores do mel, na escala de Pfund [7]. .....	11
<b>Tabela III</b> - Composição vitamínica do mel. ....	16
<b>Tabela IV</b> - Origem geográfica e ano de produção das amostras de mel. ....	25
<b>Tabela V</b> - Intervalo de concentrações referente a cada padrão, respetivos coeficientes de correlação e retas de calibração. ....	30
<b>Tabela VI</b> - Características polínicas das amostras de mel analisadas. ....	42
<b>Tabela VII</b> - Parâmetros físico-químicos: Cor, humidade e condutividade. ....	43
<b>Tabela VIII</b> - pH e acidez das amostras de mel analisadas. ....	47
<b>Tabela IX</b> - Parâmetros físico-químicos do mel: 5-HMF, índice diastásico e prolina. ....	48
<b>Tabela X</b> - Perfil de açúcares, obtido por HPLC-RI, das amostras de mel estudadas (valores expressos em g/100g de mel).....	53
<b>Tabela XI</b> - Valores nutricionais do mel: Cinzas, energia, proteínas e hidratos de carbono. ....	55
<b>Tabela XII</b> - Teor em compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das amostras de mel. ....	56
<b>Tabela XIII</b> - Compostos fenólicos e ácido abscísico identificados por UPLC/DAD/ESI-MS <sup>n</sup> nas amostras de mel em estudo. ....	59
<b>Tabela XIV</b> - Quantidade de compostos fenólicos, expressa em mg/100 g de mel, detetados nas amostras de mel.....	61
<b>Tabela XV</b> - Conteúdo das principais classes de compostos fenólicos presentes em amostras de mel. ....	63
<b>Tabela XVI</b> - Compostos voláteis presentes nas amostras analisadas .....	65
<b>Tabela XVII</b> - Resultados dos compostos voláteis encontrados nestas amostras. ....	67
<b>Tabela XVIII</b> - Caracterização da textura das amostras de mel: firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade. ....	71

## Abreviaturas e símbolos

- [M-H]<sup>-</sup> - Ião produto  
5-HMF - 5-Hidroximetilfurfural  
Abs - Absorvância  
DOP- Denominação de origem protegida  
FAO- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura  
EAG- Equivalentes de ácido gálico  
GC- Cromatografia gasosa  
HPLC- Cromatografia líquida de alta pressão  
IHC- Comissão internacional do mel  
LC- Cromatografia líquida  
LRI – Índice linear de retenção  
MS- Espectrometria de massa  
RI- Índice de refração  
SPME- Micro-Extração em fase Sólida  
 $t_R$  – tempo de retenção  
UE- União Europeia;  
UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> - cromatografia líquida de ultrapressão com deteção por fotodíodos e acoplada a espectrometria de massa tandem com ionização por electrospray  
 $UV_{max}$  – Absorção máxima no ultravioleta

# Capítulo I



## Introdução



## Introdução

O sector apícola sempre foi uma atividade tradicional ligada à agricultura e consiste na criação e gestão de colónias de abelhas com o objetivo de recolher produtos apícolas, proporcionando em simultâneo um serviço de polinização fundamental à manutenção dos ecossistemas e reprodução das plantas. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estima que das 100 espécies de culturas que fornecem 90% dos alimentos em todo o mundo, 71 são polinizadas por abelhas [1].

A apicultura é praticada em todos os países da União Europeia (UE) e caracteriza-se por uma grande diversidade de condições de produção, rendimentos e práticas apícolas. Na maioria, a espécie de abelha mais utilizada é *Apis mellifera*, existindo em Portugal uma subespécie característica da península ibérica, a *Apis mellifera iberiensis* [2]. Atualmente, tendo em conta as ameaças à sobrevivência das abelhas e o seu importante valor económico e ecológico, é necessário monitorizar continuamente o estado sanitário das abelhas, e dessa forma assegurar um conjunto de matérias-primas e produtos apícolas, que possuem potencialidades farmacológicas e nutricionais [3], sendo promotores da saúde humana. A utilização de produtos apícolas na dieta humana e na medicina popular é uma tradição referida desde a antiguidade [4].

Em Portugal, a apicultura é uma atividade robusta e em expansão devido às condições edafoclimáticas favoráveis e à rica flora apícola. No entanto, nos últimos anos, em alguns países da UE, a atividade apícola tem enfrentado uma redução no número de abelhas e perdas de colónias, particularmente nos países da Europa Ocidental incluindo França, Bélgica, Suíça, Alemanha, Reino Unido, Holanda, Itália e Espanha [5], este fenómeno não se tem verificado em Portugal com o número de colónias aproximadamente estável em torno das 600 mil.

### 1.1. Objetivos

A apicultura é um setor da agricultura de fácil implementação uma vez que requer um baixo investimento e simultaneamente possibilita um retorno significativo, quer ao nível económico quer ao nível alimentar, com um impacto positivo no equilíbrio ecológico. Este estudo tem como objetivo a caracterização de amostras comerciais

rotuladas como mel de urze proveniente de diferentes regiões de Portugal, de modo a atestar a autenticidade da origem floral designada no rótulo

De forma a atingir o objetivo proposto foram efetuadas diversas tarefas, nomeadamente:

- (i) identificação floral do mel através de análise polínica;
- (ii) avaliação de parâmetros físico-químicos, como a condutividade elétrica, pH, acidez livre, lactónica e acidez total, teor em hidroximetilfurfural, humidade, índice diastásico, teor de prolina, perfil de açúcares, cor, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e energia;
- (iii) avaliação da composição fenólica por cromatografia líquida acoplada com espectroscopia de massa (UHPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> );
- (iv) avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, realizada através da determinação do teor em fenóis totais, da avaliação do efeito bloqueador de radicais livres e do poder redutor das amostras;
- (v) avaliação do perfil em compostos voláteis por mico extração em fase sólida com análise por cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (SPME-GC/MS);
- (vi) avaliação da viscosidade e propriedades reológicas das amostras com recurso a viscosímetro rotacional e texturómetro.

## **2. Produtos apícolas**

Tradicionalmente o mel é considerado o produto primário mais importante da apicultura, sendo muito apreciado em todo o mundo pois é bastante utilizado no dia-a-dia de muitas famílias, essencialmente, na alimentação de crianças e idosos devido às suas propriedades medicinais e elevado valor nutritivo.

Na mitologia grega o mel, a que os Gregos e Romanos chamavam “ambrósia”, era considerado um “alimento digno de Deuses”. Ainda antes da apicultura ser considerada uma atividade agrícola, o mel já era explorado como alimento, como adoçante e como símbolo empregado em cerimónias religiosas, mágicas e terapêuticas, isto para além do consumo de mel fermentado, o hidromel, considerado então como uma bebida revigorante.

Atualmente, a colmeia é vista não apenas pelo mel que se pode recolher, mas também como fonte de um conjunto de outros produtos com diferentes características e potencialidades, como a cera, o pólen, a própolis, a geléia real ou o veneno de abelha. O estudo e aprofundamento das características destes produtos é hoje em dia objeto de vários estudos científicos, não apenas para valorizar a apicultura mas para procurar novos usos e explorar a capacidade nutricional e farmacológica destes produtos.

## 2.1. Pólen

Atualmente em Portugal o pólen apícola é um produto da colmeia ainda pouco valorizado pela maioria dos apicultores, devido ao desconhecimento dos atributos que este produto possui e à falta de conhecimentos técnicos.

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas (**Figura 1**), gâmetas masculinos localizados nas anteras de estames, indispensáveis para a fecundação do órgão sexual feminino da flor e transformação da flor em frutos, assegurando a sobrevivência das espécies.



**Figura 1** – Pólen de abelha

As abelhas recolhem este pólen ao visitar as flores, aglutinando-o com pequenas quantidades de néctar e secreções salivares das abelhas obreiras [6-8]. Após a recolha, transportam-no para a colmeia nas patas traseiras onde é armazenado e colocado em alvéolos [9]. Durante este processo, o pólen é compactado e misturado com um pouco de néctar até se obter uma massa espessa que passará por várias transformações e fermentações devido à ação enzimática das secreções salivares, à humidade e também à temperatura existente na colmeia, conferindo-lhe maior digestibilidade.

O pólen é extremamente importante para a colmeia, é uma grande fonte de alimento para as larvas proporcionando-lhes nutrientes importantes para o seu desenvolvimento como as proteínas, aminoácidos essenciais [10] e hidratos de carbono, lípidos (ácidos gordos e esteróis), vitaminas e minerais [11]. Ao contrário do mel, não

precisa de ser armazenado na colmeia em quantidades muito superiores às necessidades das colónias [12].

## 2.2. Cera

A cera é um dos produtos apícolas de origem animal essencial para gestação das abelhas e crescimento da colónia, para o armazenamento do mel e pólen, para a regulação da temperatura interna da colmeia, para a qualidade do mel e também é importante na discriminação de odores [13]. A cera é segregada por oito glândulas ceríferas, situadas nos quatro últimos esternos da parte ventral do abdómen das abelhas obreiras com idades compreendidas entre os 12 e os 18 dias. Estas produzem escamas de cera virgem de cor branca que com a ajuda das mandíbulas vão moldando para construção dos alvéolos de cera (**Figura 2**).



**Figura 2** - Cera de abelha

Nesta fase, a temperatura e humidade são fatores fundamentais para que as abelhas a consigam moldar [13]. Ao longo do tempo a cera vai sofrendo transformações quando em contato com o pólen, o mel e a própolis, adquirindo uma cor amarela [14, 15]. À temperatura ambiente a cera é uma substância sólida, hidrofóbica, maciça, de consistência escorregadia com uma composição bastante complexa, pois possui uma mistura de substâncias de carácter lipídico, proteínas, hidrocarbonetos, ceroleína, vitamina A e outras substâncias com diferentes propriedades [14].

## 2.3. Própolis

A própolis (**Figura 3**) é uma substância resinosa ou goma, com uma composição complexa, resultante das resinas libertadas por certas plantas nas folhas e flores, exsudados de plantas nos gomos e botões para a proteção de lesões, e recolhida pelas abelhas que adicionam secreções salivares, enzimas, cera de abelha e outros materiais [16], transformando a substância inicial num produto fundamental para a colónia. No

interior da colmeia, a própolis é importante para o revestimento dos favos, para recobrir as paredes da colmeia, para estabilizar a temperatura e a umidade no interior, servindo de desinfetante natural e contribuindo para a eliminação de fungos e bactérias, preencher as fendas da colmeia, restringir as entradas de inimigos, mumificar inimigos que as abelhas mataram mas que não conseguem transportar para fora da colmeia [4], ou para impermeabilizar as paredes dos favos antes da postura dos ovos da rainha [17].



**Figura 3** – Própolis.

A própolis pode apresentar várias cores, como tonalidades castanhas, vermelhas, esverdeadas, amarelas ou até mesmo tonalidades bastante escuras dependendo da idade e da sua origem botânica. A consistência da própolis é altamente influenciada pela temperatura e a composição química é determinada pela localização geográfica das colmeias e pela origem das resinas recolhidas [17] conferindo-lhes múltiplas propriedades e aplicações na indústria farmacêutica e na cosmética.

Os pigmentos que estão em grande quantidade na própolis são os flavonoides [18], mas existem mais de 200 compostos identificados como: vitaminas, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos e seus ésteres, álcoois, aldeídos, hidratos de carbono, minerais e cetonas. Normalmente a própolis é composta por cerca de 50% de resinas vegetais, 5 % de pólen de flores, cerca de 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos e 5% de outras substâncias podendo ser impurezas [12].

#### **2.4. Veneno da abelha -Apitoxina**

O veneno da abelha é também um dos produtos da colmeia de origem animal, produzido por uma glândula ácida situada no interior do abdômen das abelhas operárias, ligada no seu extremo a uma bolsa de armazenamento do veneno, constituindo parte do órgão de defesa. O veneno é um líquido transparente, solúvel em água e com um sabor

amargo e acre, composto essencialmente por proteínas, enzimas, aminoácidos, lípidos e ácidos orgânicos A melitina é um dos péptidos que se encontra em maior quantidade no veneno, sendo o principal componente responsável pelos efeitos dolorosos ou letais do veneno da abelha.

Para a recolha do veneno de abelha é utilizado um dispositivo eletrónico colocado à entrada da colmeia, o qual através de pequenos impulsos elétricos estimula o ataque das abelhas ao dispositivo. Ao longo dos ataques as abelhas libertam o veneno sobre uma placa de vidro, não causando impactos negativos na abelha, uma vez que o ferrão não penetra na placa de vidro, sendo retraído sem danos.

## 2.5. Geléia real

A geléia real é uma secreção amarelada produzida pelo sistema glandular cefálico (hipofaringe e glândulas mandibulares) das abelhas com idades entre o 4º e o 15º dia de vida. Esta secreção serve de alimento a todas as larvas de uma colónia [14] na fase inicial de desenvolvimento até ao 3º dia de vida (**Figura 4**). Após o 3º dia só a rainha e as larvas da rainha é que continuam a receber a geléia real, conferindo-lhe um desenvolvimento fisiológico que as diferencia de todas as restantes abelhas presentes na colónia.



**Figura 4-** Geléia real [15].

A geléia real possui uma composição complexa, incluindo proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, ácidos orgânicos, esteróis, fenóis, sais minerais (cobre, zinco, ferro, cálcio, potássio e sódio) e pequenas quantidades de vitaminas (vitaminas do complexo B, vitamina C, vitamina E), entre outros [19-21].

Atualmente, a geléia real é considerada um produto apícola natural dotado de propriedades biológicas antioxidantes que tem levantado muitos interesses em inúmeras aplicações, como no caso de suplementos dietéticos, cosmética, produtos farmacêuticos e na adição em alimentos saudáveis para promover os benefícios associados à saúde [22].

## 2.6. Mel

De acordo com a legislação comunitária [Diretiva 2001/110/CE, de 20 de Dezembro] [23], entretanto transposta para a ordem jurídica nacional através do Decreto-Lei nº214/2003, de 18 de setembro [24], encontra-se estabelecido que o mel está descrito como “uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia”.

Para preparar o mel as abelhas recolhem o néctar em diversas espécies de flores num raio de 3 km em redor da colmeia. Após a sucção do néctar das flores, a primeira fase do processo de transformação do néctar em mel ocorre logo no pré-estômago das abelhas com ajuda de enzimas, as quais desdobram a sacarose em frutose e glucose. Posteriormente, na segunda fase designada trofalaxia, as abelhas transferem entre si o néctar promovendo ainda mais a adição de secreções salivares e a ocorrência de transformações enzimáticas, originando os açúcares simples, facilmente assimiláveis pelo organismo. Seguidamente, as abelhas depositam o mel elaborado nos alvéolos da colmeia onde irá decorrer uma redução dos teores de humidade [25]. A selagem final dos favos, designada operculação, ocorre quando a humidade atinge aproximadamente os 20%.

### 2.6.1. Classificação do mel

Os diplomas atualmente em vigor (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro), [24] estabelecem a classificação legal do mel com base na sua origem botânica, modo de produção e apresentação. De acordo com o modo de produção e apresentação, o mel pode ser classificado em mel de favos, mel com pedaços de favos, mel centrifugado, mel prensado ou mel filtrado. Já considerando a origem botânica, o mel pode ser classificado em dois tipos distintos: o mel de néctar que é “obtido a partir do néctar das plantas”, ou 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”. O impacto da origem botânica é sem dúvida

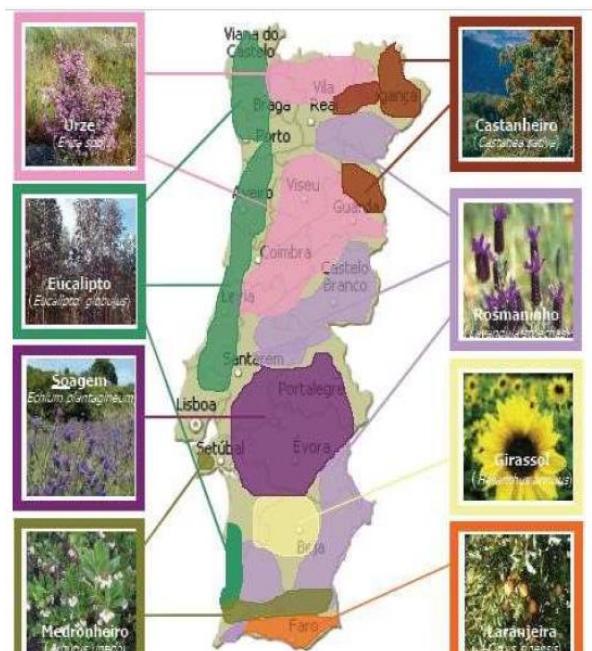
um elemento fundamental na valorização do mel, uma vez que condiciona todas as características sensoriais e físico-químicas.

### **2.6.2. Origem botânica**

A melissopalinologia é a metodologia usada na análise polínica e é de grande importância no processo de determinação da origem botânica, geográfica e no controlo de qualidade alimentar, permitindo detetar possíveis adulterações no mel [26]. De acordo com a origem botânica, os méis de néctar podem ser classificados como méis monoflorais, se forem produzidos a partir de uma só família ou espécie de planta, ou como multiflorais quando não há uma espécie floral que se destaque. Esta avaliação é frequentemente efetuada através de uma análise aos grãos de pólen que estão presentes no mel, considerando que ao recolher o néctar na flor as abelhas transportam grãos de pólen que irão inadvertidamente introduzir no mel. A determinação da análise polínica é efetuada através da contagem microscópica de grãos de pólen contidos no mel. Segundo o Instituto de Investigação Agrário e Alimentar de Madrid, o pólen é considerado dominante quando representa (>45%), indicando-nos a origem botânica do mel, (15 a 45%) indica outras plantas visitadas, pólen acompanhante, (3 a 15%) indica pólen importante, fornece a origem geográfica da amostra de mel, (1 a 3%) indica pólen esporádico e (<1%) indica pólen presente [27]. Assim, a presença destes grãos de pólen reflete as flores onde foi recolhido o néctar, e a sua quantidade permite avaliar a frequência com que as abelhas visitaram as flores. Se o pólen predominante na constituição de um mel estiver presente numa proporção igual ou superior a 45% [28] como acontece no mel de urze o mel é classificado como monofloral. A quantidade de pólen produzida por uma flor não é, no entanto, idêntica entre todas as plantas, pelo que há situações onde o pólen está sobre-representado, como no mel de castanheiro, e outras onde está sub-representado, como no mel de rosmaninho. Nestes casos, o valor a partir do qual se considera o mel como monofloral é diferente, oscilando entre 90 e 15 %, nos dois méis referidos anteriormente, respetivamente [29].

Portugal é um país com uma flora melífera muito rica e diversificada, sendo maioritariamente constituída por espécies de plantas silvestres mas também algumas cultivadas. Esta diversidade permite obter méis monoflorais muito característicos,

encontrando-se descritos oito méis monoflorais (**Figura 5**), sendo os mais representativos: o mel de rosmaninho (*Lavandula stoechas*), nas zonas de cota inferior a 400 m; o mel de urze (*Erica umbellata*), até à cota de 900 m; e o mel de castanheiro (*Castanea sativa*), produzido em zonas de montanha (entre os 700 e 1200 m) [25]. Existem ainda algumas espécies no território português que originam méis com outras características físico-químicas, como o caso do alecrim (*Rosmarinus officinalis*), medronheiro (*Arbutus unedo*), soagem (*Echium plantagineum*), poejo (*Mentha pulegium*), laranjeira (*Citrus sinensis*), eucalipto (*Eucalyptus spp.*) e girassol (*Helianthus annuus*), (**Figura 5**). Para além destes, existem ainda um conjunto de méis multiflorais, onde não há uma espécie floral única que se destaque.



**Figura 5-** Méis monoflorais em Portugal [25]

### 2.6.3. Parâmetros de qualidade do mel

Atualmente, a nível internacional, as propriedades de um mel são avaliadas em função de um conjunto de parâmetros físicos e químicos de qualidade estabelecidos na norma do *Codex Alimentarius* [30], e refletindo-se na legislação comunitária [Diretiva 2001/110/CE, de 20 de Dezembro] [23], entretanto transposta para a ordem jurídica nacional através do Decreto-Lei nº214/2003, de 18 de setembro [24] (**Tabela I**).

**Tabela I** - Parâmetros de qualidade do mel.

Parâmetros	Limites	Referências
Humidade (%)	<20	<i>Codex Alimentarius</i> [30]
Exceções	<23 <i>Calluna</i>	
	> 60 mel de néctar	
Teor de açúcar	> 45 mel de melada ou mistura de mel de	
Frutose +Glucose (%)	melada com mel de néctar	<i>Diretiva Europeia</i> [23]
Teor de sacarose (%)	< 5	
	<10 ( <i>Robinia pseudoacacia</i> ; <i>Medicago sativa</i> ; <i>Banksia menziessii</i> ;	
Exceções	<i>Hedysarum</i> ; <i>Eucalyptus camadulensis</i> ; <i>Eucryphia lucida</i> ; <i>Eucryphia milligani</i> ; <i>Citrus spp.</i> )	<i>Diretiva Europeia</i> [23]
	<15 ( <i>Lavandula spp.</i> ; <i>Borago officinalis</i> )	
Matéria insolúvel (%)	<0,1	
	<0,5 méis presados	<i>Codex Alimentarius</i> [30]
Exceções		
Conduтивidade mS.cm <sup>-1</sup>	< 0,8	
	> 0,8 mel de melada e <i>Castanea</i>	<i>Codex Alimentarius</i> [30]
	( <i>Arbutus unedo</i> ; <i>Erica</i> ; <i>Eucalyptus</i> ; <i>lima</i> ; <i>Tilia spp.</i> ; <i>Calluna vulgaris</i> , <i>Leptospermum</i> ; <i>Melaleuca spp.</i> )	
Acidez livre meq.kg <sup>-1</sup>	<50	<i>Codex Alimentarius</i> [30]
5-HMF mg.kg <sup>-1</sup>	<40	
Exceções	<80 méis de climas tropicais	<i>Diretiva Europeia</i> [23]
Diastase (DN)	>8 para mel determinado após o processamento e / ou mistura	<i>Codex Alimentarius</i> [30]
	>3 no caso de méis com baixo teor de enzima natural	
Prolina mg.kg <sup>-1</sup>	>180	IHC [31]

O interesse pelos méis monoflorais tem aumentando em todo o mundo, não apenas por parte dos apicultores, que assim conseguem oferecer um conjunto variado de produtos, mas em particular por parte dos consumidores que procuram méis com características organoléticas diferenciadoras. Efetivamente, as propriedades sensoriais e

físicas e químicas [32] de um mel variam em função do tipo de espécie floral que fornece o néctar, contribuindo também para a sua qualidade as condições ambientais e sazonais, as técnicas aplicadas para gestão da colónia, o manuseamento e processamento do mel e o seu armazenamento [14].

## 2.6.4. Propriedades organoléticas

### 2.6.4.1. Cor

A cor do mel depende da origem do néctar e resulta da absorção da luz por parte dos seus componentes em diversos comprimentos de onda, particularmente carotenos, xantofilas e flavonóides [33]. A sua determinação é uma ferramenta importante para classificar os diferentes méis [34] podendo variar do branco-água, branco até ao âmbar escuro, conforme o padrão comercial de classificação, na escala de Pfund, (**Tabela II**) [7].

**Tabela II** - Classificação das cores do mel, na escala de Pfund [7].

Cor do mel	Escala de Pfund (mm)
Branco água	0-8
Extra branco	8-16,5
Branco	16,5-34
Âmbar extra claro	34-50
Âmbar claro	50-85
Âmbar	85-114
Âmbar escuro	Mais de 114

O armazenamento, o processamento, os fatores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura na qual o mel amadurece na colmeia são fatores que influenciam a cor do mel devido à ocorrência de reações de Maillard, caramelização da frutose e reações de polifenóis [35]. O processo de escurecimento do mel ao longo do tempo é influenciado por uma série de fatores, tais como a proporção de frutose/glucose, o conteúdo de azoto e aminoácidos livres, o conteúdo de minerais, a presença de substâncias polifenólicas, bem como a instabilidade da frutose em solução ácida [36].

#### **2.6.4.2. Aroma e sabor**

O perfil aromático de um produto alimentar influencia a qualidade organolética e a sua autenticidade [37]. O sabor global do mel é um critério decisivo para os consumidores. Os aromas que podem estar presentes nos méis são o aroma químico, mineral, fresco, floral, amadeirado, quente, a deterioração e o aroma vegetal [38]. Os aromas muito intensos e persistentes revelam-se nos méis de eucalipto e urze, pois estes estão associados ao aroma de madeira molhada e húmus/cogumelos [39]. Já os méis claros apresentam um aroma mais suave e um maior conteúdo em corantes lipossolúveis. A deterioração nos méis pode levar à libertação de aromas produzidos quando existem teores de água no mel superiores a 20%, desenvolvendo-se leveduras osmofílicas que vão metabolizar a frutose e glucose provocando a fermentação e desencadeia a produção de ácido acético [40].

Relativamente ao sabor, os méis podem ser avaliados por alguns parâmetros como a doçura que está relacionada com a razão frutose/glucose, a acidez que depende do pH, o amargo que está relacionado com a presença de sais minerais e compostos fenólicos (como os flavonóides), o salgado que tem a ver com a quantidade de sais minerais presentes no mel, o adstringente, também associado aos compostos fenólicos ou refrescante [38]. Os méis mais escuros apresentam geralmente uma acidez mais elevada, e um conteúdo superior de substâncias minerais e aminoácidos, como a tirosina e o triptofano e mais compostos fenólicos.[29]

#### **2.6.5. Parâmetros físico-químicos**

O mel é uma mistura complexa constituída principalmente por açúcares simples como a frutose e a glucose [41], água, hidratos de carbono mais complexos e um conjunto de outras substâncias [42] que se encontram em menor proporção como proteínas, aminoácidos, compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), ácidos orgânicos, vitaminas, lípidos [43], produtos da reação de Maillard, minerais e outras substâncias fitoquímicas [41]. A presença conjunta destes compostos confere ao mel as suas propriedades específicas e a sua avaliação é utilizada como critério de qualidade do produto e como fator de valorização.

### 2.6.5.1. Açúcares

Os constituintes maioritários do mel, os hidratos de carbono, correspondem a cerca de 95-99% da matéria seca presente no mel representando os dois monossacarídeos, glucose e a frutose, 85 a 90% dos açúcares totais [44]. Adicionalmente, é também frequente encontrar a presença de sacarose, bem como outros dissacarídeos e trissacarídeos, como a maltose, turanose, isomaltose, erlose, melizitose, entre outros [45]. A presença destes açúcares é influenciada pela origem botânica do néctar e pela ação das abelhas durante o processo de colheita e maturação do mel na colmeia [45] condicionando as propriedades físico-químicas finais do mel, nomeadamente a viscosidade, a densidade, a cristalização, o sabor e o valor energético [46, 47].

De acordo com (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro) [24], para a classificação de um mel como mel de néctar é obrigatório a presença de um teor de glucose e frutose superior a 60%. Já para os méis classificados como de melada, o valor para estes dois açúcares não poderá ser inferior a 45%. Neste último tipo de mel é mais frequente que o perfil de açúcares seja acompanhado pela presença de trissacarídeos resultante do metabolismo dos insetos produtores de melada. Geralmente, a proporção entre frutose e glucose é semelhante ou ligeiramente superior para a frutose. Esta proporção é importante para identificar tendência à cristalização do mel, uma vez que a glucose é um açúcar mais insolúvel em água, pelo que valores de frutose/glucose próximos de um correspondem a méis com maior tendência para cristalizar. Este processo também pode fomentar a fermentação do mel, devido ao aumento do teor de humidade da fase líquida [48].

O teor em sacarose é também um fator importante na avaliação da qualidade do mel, pois a sua presença em teores elevados pode significar uma adulteração do mel resultante da alimentação artificial das abelhas com açúcares, ou ainda uma recolha prematura dos favos de mel, o que pode resultar numa ação incompleta de enzimas [46]. O valor máximo admitido pela legislação para este açúcar é de 5%, com exceção de alguns méis devidamente caracterizados onde este valor pode ser ultrapassado (**Tabela I**).

### **2.6.5.2. pH, acidez livre, acidez lactónica e acidez total**

Os ácidos orgânicos são responsáveis pela acidez do mel e contribuem para a estabilidade microbiana, impedindo a sua deterioração e ajudando a conferir um sabor característico aos diferentes méis [49]. A acidez do mel tem origem nos ácidos orgânicos provenientes do néctar, por ação da glucose oxidase, que forma o ácido glucónico, e pela ação de microrganismos durante a fase de maturação do mel.

O teor de acidez constitui apenas 0,6% dos compostos presentes nos méis [44] e segundo a regulamentação portuguesa (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro) [24], o limite máximo para a acidez é de  $50 \text{ meqkg}^{-1}$  de mel. A presença de níveis mais elevados de acidez pode ser indicativo da ocorrência de fermentação, ou seja conversão de açúcares e ácidos orgânicos em ácido acético, por ação bacteriana [50]. De uma forma geral, os méis de néctar mais claros apresentam menores valores de acidez enquanto os méis mais escuros e os de melada apresentam os valores mais elevados.

O pH é outros dos parâmetros utilizados no controlo de qualidade e associado à presença de ácidos orgânicos. O seu valor no mel varia entre 3,4 e 6,1 com um valor médio de 3,9 [51]. Estes valores baixos, que asseguram a sua estabilidade e inibem o desenvolvimento de microrganismos, resultam não apenas dos ácidos livres mas também da ação tampão e minerais [52].

### **2.6.5.3. Humidade**

A água é o segundo maior componente do mel e bastante importante na determinação do tempo de conservação e armazenamento. A sua presença é determinada pela origem do néctar mas principalmente pelas condições climáticas de uma dada região, da época de recolha do mel e do seu grau de maturação alcançado na colmeia [46].

A quantidade de água presente no mel é avaliada através da percentagem de humidade e de acordo com a legislação (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro) [24] (**Tabela I**), não deve ultrapassar os 20%, de modo a garantir a sua estabilidade e prevenir o desenvolvimento de certos microrganismos responsáveis pela degradação. Teores de humidade mais elevados, para além de influenciarem a viscosidade [44], podem acelerar a ocorrência de processos de fermentação, alterando o odor e sabor, e dificultando a conservação e o seu armazenamento.

#### **2.6.5.4. Teor em cinzas e condutividade**

O teor em cinzas é uma medida que avalia o conteúdo mineral presente num mel, podendo ser indicativo da origem geográfica, origem botânica, bem como da poluição ambiental, já que depende do tipo de solo onde as flores usadas para o néctar estão. O elemento mineral mais abundante no mel é o potássio, podendo encontrar-se outros em menor concentração, tais como o cálcio, iodo, sódio, cobre, ferro e manganês [53].

O teor em cinza também pode ser usado como parâmetro nutricional [54]. Normalmente o mel apresenta um máximo de 0,6% para o mel de néctar e 1% para o mel de melada [55], sendo um critério bastante utilizado na autenticidade do produto [56, 57]. A quantidade de cinzas presente nos méis está relacionada com a condutividade elétrica e pela cor e aroma, sendo que os méis escuros apresentam um teor em cinzas mais elevado que os méis de cor clara [46]. Embora o *Codex Alimentarius* [30] não forneça valores para este parâmetro, estudos prévios apresentam um valor médio de 0,17% (m/m) no mel, podendo variar entre 0,02% e 1,03% [58].

Além do teor em cinzas, a condutividade elétrica do mel está relacionada com a acidez devido à presença de iões, ácidos orgânicos e proteínas, sendo que quanto maior o seu conteúdo, maior a sua condutividade. Valores elevados de condutividade são geralmente sinônimo de méis mais mineralizados, como são os casos dos méis de melada ou de castanheiro, enquanto méis de rosmaninho ou alecrim apresentam valores de condutividade bastante inferiores. Este parâmetro é por isso muito frequentemente utilizado para diferenciar méis de néctar e melada, sendo que os méis de melada apresentam valores de condutividade superior a  $0,8 \text{ mScm}^{-1}$  [56]. Como este parâmetro é diretamente relacionado com o teor em cinzas, foi recentemente incluído no *Codex Alimentarius*, substituindo assim a determinação das cinzas no mel [54].

#### **2.6.6. Parâmetros nutricionais**

##### **2.6.6.1. Compostos azotados**

O mel apresenta um conjunto de substâncias azotadas presentes em baixas concentrações, maioritariamente proteínas e aminoácidos livres. A origem destes compostos é maioritariamente vegetal, provenientes do néctar e em especial do pólen das

plantas, mas também pode ter origem nas secreções das glândulas salivares das abelhas quando estas manipulam o néctar e ajudam na maturação do mel [51, 53].

A prolina é o aminoácido livre que se encontra em maior quantidade no mel, representando mais de 50% de todos os aminoácidos presentes. Por esta razão é também um dos parâmetros utilizados para controlar a qualidade do mel, e em especial a presença de adulterações. Quando o teor de prolina presente no mel apresenta uma concentração baixa, inferior a  $0,18 \text{ mg.g}^{-1}$ , é indicativo da adulteração do mel com açúcar [31].

### 2.6.6.2. Vitaminas

O mel contém também um conjunto de vitaminas provenientes do pólen e do néctar recolhido pelas abelhas, sendo possível encontrar vitaminas do complexo B, tais como  $B_1$  (tiamina),  $B_2$  (riboflavina),  $B_3$  (niacina),  $B_5$  (ácido pantoténico) e  $B_6$  (piridoxina), para além de vitamina C (ácido ascórbico), vitamina K (filoquinona), vitamina D e vitamina E [59]. A quantidade destes compostos é reduzida e tende a diminuir quando são aplicados processos de filtração [60].

**Tabela III** - Composição vitamínica do mel.

Vitaminas	(mg/100g)
Filoquinona (Vitamina K)	0,025
Tiamina (Vitamina $B_1$ )	0,00-0,01
Riboflavina (Vitamina $B_2$ )	0,01-0,02
Piridoxina (Vitamina $B_6$ )	0,01-0,32
Niacina (Vitamina $B_3$ )	0,10-0,20
Ácido pantoténico (Vitamina $B_5$ )	0,02-0,11
Ácido ascórbico (Vitamina C)	2,2-2,5

**Fonte:** Adaptado de Bogdanov *et al.*, 2008 [59]

### 2.6.7. Caracterização bioquímica

#### 2.6.7.1. 5-Hidroximetilfurfural e índice diastásico

A atividade diastásica e a presença de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) são dois indicadores de qualidade do mel, associados com a sua frescura e que se encontram

relacionados com o tempo de armazenamento e/ou aplicação de aquecimento excessivo no mel. De acordo com a regulamentação (**Tabela I**), o valor máximo de 5-HMF num mel não deverá ultrapassar  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$ , com exceção dos méis provenientes de regiões tropicais onde esse valor pode ser mais elevado. Um mel de elevada qualidade deverá possuir um teor de 5-HMF baixo e um índice diastásico elevado [71].

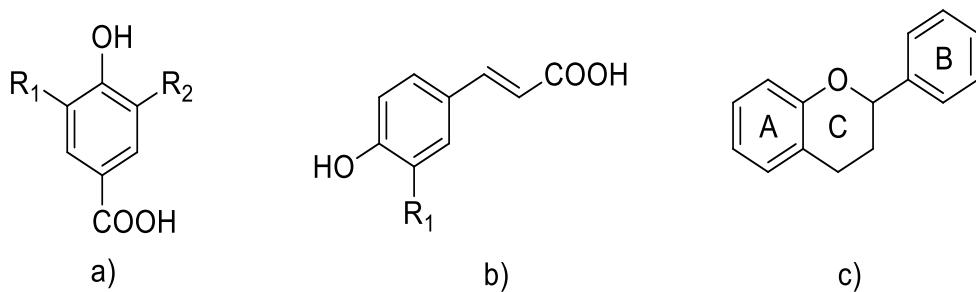
Normalmente, o mel contém 5-hidroximetilfurfural em pequenas quantidades, mas o seu aparecimento pode ser desencadeado pela ação da temperatura, luminosidade, níveis de pH, tempo de armazenamento e processamento [72]. A formação de 5-hidroximetilfurfural, resultante da presença de açúcares simples e água em meios ácidos que favorecem reações de desidratação de hexoses e reações de Maillard [62, 73], conduz ao escurecimento do mel e à perda do seu sabor e aroma [63, 74]. Por esta razão é fundamental conservar o mel em locais de baixa luminosidade e afastado de fontes de calor. Adicionalmente, durante o processamento, e em particular na descristalização, deve ser avaliada a temperatura a aplicar, nunca devendo ultrapassar os 45 a 50°C.

O mel possui na sua composição pequenas quantidades de enzimas, de entre as quais se destacam, a diastase ( $\alpha$  e  $\beta$ -amilase), a invertase ( $\alpha$ -glucosidase) e a glucose-oxidase, mas existem outras enzimas tal como a catalase e a fosfatase ácida. Estas enzimas, segregadas pelas abelhas, têm a função de catalisadores biológicos, ou seja, são capazes de acelerar a maior parte das reações de transformação do mel a partir do néctar e da melada, mas são também responsáveis pelas transformações que ocorrem nas características físico-químicas e nutricionais de alguns méis [75]. A atividade enzimática varia muito entre amostras devido à adição de diferentes quantidades de secreções salivares no mel por parte das abelhas e também varia consoante as condições climáticas [59]. O índice diastásico é uma medida da atividade enzimática da diastase, normalmente expressa na escala de Gothe [3, 30] e fornece indicações sobre a qualidade do mel, uma vez que as amilases são extremamente sensíveis ao calor e a sua atividade diminui progressivamente durante o armazenamento [53]. Assim, um valor baixo do índice diastásico no mel reflete procedimentos de sobreaquecimento com temperaturas acima de 60°C, condições de armazenamento inadequadas ou adulterações realizadas no mel [76]. Segundo os regulamentos internacionais (**Tabela I**) o valor mínimo permitido pela legislação para o índice diastásico é de 8 (na escala de Gothe) [3,6].

## 2.6.8. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos do mel são metabolitos secundários das plantas provenientes do néctar, do pólen e da própolis. No mel, a sua quantidade pode variar no intervalo de 5-1300 mg/Kg [61]. Estes compostos estão divididos em diferentes classes, dependendo das suas características estruturais. No mel, os mais representativos são os flavonóides, os ácidos fenólicos e seus derivados, (Figura 6). Dentro dos ácidos fenólicos vamos encontrar os derivados do ácido benzóico (como o ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido gálico e ácido elágico, (Figura 6, a)) e do ácido hidroxicinâmico (como o ácido *p*-cumárico e ácido cafeico, (Figura 6, b)).

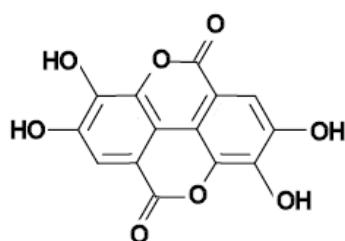
Os flavonóides englobam uma classe muito importante de compostos encontrados com grande frequência na natureza, unicamente em vegetais, que além de possuírem propriedades antioxidantes são considerados pigmentos. Todos os flavonóides possuem uma estrutura base C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, em que dois dos anéis da molécula são anéis aromáticos (Figura 6). Na sua estrutura, possuem vários grupos hidroxilo ligados a um anel aromático (Figura 6) e dependendo da complexidade estrutural e principalmente do estado de oxidação do anel central, os flavonóides podem ser sub-divididos em flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, isoflavonas, antocianinas e chalconas [61]. Os flavonóis são um grupo abundante e ocorrem geralmente esterificados com glicosídeos e/ou glucorónidos [62]. De uma forma geral, mais de 90% dos flavonóides do mel têm a sua origem na própolis (como a pinobanksina, pinocembrina e crisina) [54].



**Figura 6-** Estrutura geral dos compostos fenólicos mais comuns encontrados no mel: a) - ácido hidroxibenzóico (ácido *p*-hidroxibenzóicos, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H); b) – ácido hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico, R<sub>1</sub>=H; ácido cafeico, R<sub>1</sub>=OH); c) estrutura geral de um flavonóide.

A determinação do perfil fenólico, normalmente efetuada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, é uma ferramenta importante para a caracterização

geográfica e botânica do mel. Alguns compostos estão descritos como marcadores de origem, como a hesperitina para o mel de laranjeira [63], campeferol no mel de alecrim [64], a quercetina no mel de girassol [65], a naringenina e a luteolina no mel de rosmaninho [66], miricetina, tricetina, luteolina, ácido gálico para o eucalipto [67], ácido homogentísico para medronheiro [68], ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico para castanheiro [69]. Para o mel de urze, o ácido elágico (**Figura 7**), ácido benzóico, têm sido utilizados como marcadores de origem botânica [70].



**Figura 7-** Estrutura do ácido elágico.

Além da sua importância como marcadores de origem botânica, o interesse nos compostos fenólicos do mel tem aumentado devido ao interesse no estudo da atividade antioxidante atribuída a estes compostos devido à sua capacidade de bloquear ou reduzir os radicais livres [54].

### 2.6.9. Compostos voláteis

Os compostos voláteis, componentes com baixo peso molecular, conjuntamente com os ácidos orgânicos, os aminoácidos e as proteínas, contribuem para definir o aroma que caracteriza cada tipo de mel [77]. A presença de compostos voláteis no mel pode fornecer informações acerca da sua origem botânica, permitindo averiguar se foi produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores ou de exsudados secretados pelas plantas ou insetos [77]. Os compostos voláteis podem ter origem no néctar das plantas, na transformação de compostos vegetais pela abelha, diretamente gerados pela abelha, no aquecimento ou manuseamento resultante do processamento e armazenamento de mel ou na contaminação microbiana ou ambiental [54]. Mais de 600 compostos voláteis foram identificados no mel, como misturas complexas de diferentes classes de compostos como, terpenos, norisoprenóides, compostos fenólicos, derivados de benzeno, álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, ácidos gordos, hidrocarbonetos lineares e cíclicos. O seu impacto no aroma do

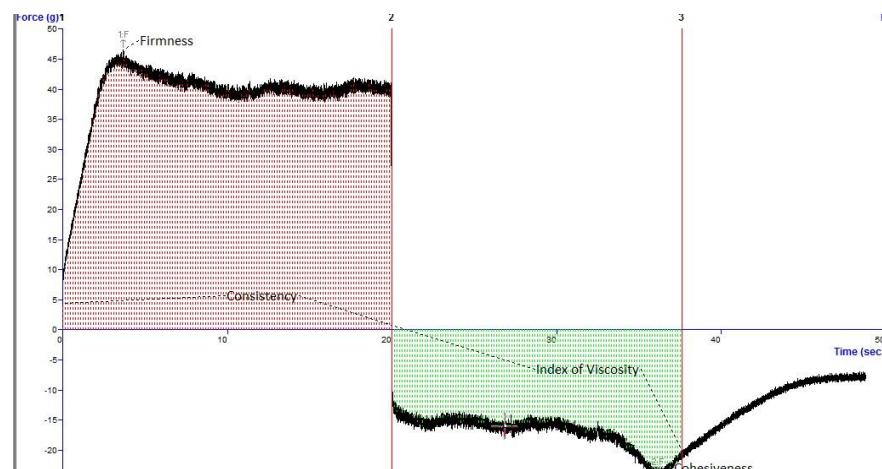
mel depende da relação entre a sua concentração e o respetivo limite de deteção [54]. Os compostos de origem terpénica (linalol, óxido linalol, nerol, geraniol,  $\alpha$ -terpineol, etc.), embora em pequenas proporções, encontram-se num grande número de méis. A sua presença parece estar relacionada direta ou indiretamente com as plantas visitadas pelas abelhas [61]. Assim compostos como o óxido de rosa (*cis*) e o éter de tilia (3,9-epóxi-1,4-(8)-*p*-mentadieno) que foi detetado tanto no néctar de tila como na mel de tília, provavelmente passam da flor para o mel sem serem modificados pela abelha, enquanto compostos como os derivados de linalol, o hotrienol e os aldeídos de lilás (4 isómeros) são alterados pelas abelhas. Também é comum encontrar derivados do furano, como o furfural, o hidroximetilfurfural e o álcool furfúlico, as hidroxicetonas do tipo 1-hidróxi-2-propanona e 3-hidróxibutan-2-ona. Estes derivados de furano e pirano são resultantes das reações de Maillard que podem ocorrer durante o processamento térmico do mel ou no seu acondicionamento [61]. Vários voláteis foram descritos como marcadores botânicos como o antranilato de metilo para o mel de citrinos, a isoforona para o medronheiro, derivados de acetofenona, como a 3-aminoacetofenona para o castanheiro, as dicetonas, compostos com enxofre e alcanos para o eucalipto e o hexanal e heptanal destacaram-se nos méis de rosmaninho [54].

Nos méis com origem em Ericaceae (urzes) foram identificados vários compostos voláteis que caracterizam este tipo de mel, como o *p*-anisaldeído, álcool 2-feniletílico fenilacetaldeído, (E)- $\beta$ -damascenona, eugenol, vanilina, 2-acetil-1-pirrolina, metional, 4-vinilguaiacol [78], o ácido fenil-láctico, o ácido fenilpropiónico, ácido benzóico, ácido fenilacético [79], o ácido 2-hidroxi-3-fenil-propiónico e norisoprenóides como a  $\alpha$ -,  $\beta$ -isoforona e 4-oxoisoforona [80].

### **2.6.10. Caracterização reológica**

A qualidade de produtos alimentares, como é o caso do mel, é determinada por uma diversidade de parâmetros de natureza física, química e sensorial. Do ponto de vista do consumidor, as características sensoriais do mel assumem uma enorme importância para a avaliação da sua qualidade. No entanto, a avaliação das características sensoriais envolve frequentemente um elevado grau de complexidade e subjetividade.

Nos últimos anos, e com o objetivo de conferir uma maior objetividade a esta avaliação, têm sido desenvolvidos e utilizadas metodologias que envolvem a caracterização reológica de matrizes alimentares. São utilizados equipamentos denominados reómetros que avaliam o comportamento da amostra quando submetida a algum tipo de deformação. Os resultados são visualizados sob a forma de gráfico (**Figura 8**), sendo possível avaliar parâmetros como a coesão, consistência, firmeza e viscosidade. Estes parâmetros reológicos estão diretamente relacionados com a composição química do mel, os fatores físicos, o teor de umidade, a presença de cristais e a temperatura [81].



**Figura 8** -Modelo de gráfico obtido pelo reómetro.

A firmeza é uma escala de resistência que envolve forças compressivas, sendo um parâmetro relacionado com a primeira força mecânica aplicada no momento. Segundo o Decreto-Lei 126/2015 a consistência do mel pode apresentar-se de várias formas, tais como um fluido, espesso ou parcial ou totalmente cristalizado. A viscosidade está relacionada com a fluidez das partículas com as propriedades de resistência ao escoamento por parte dos fluidos e representa-se pela relação entre a tensão de corte ( $\sigma$ ) e velocidade de deformação ( $\gamma$ ) do alimento [82], e também com a temperatura pois possuem uma estrutura molecular em mudança, quando exposto a temperatura ambiente ele permanece com as suas próprias características, exposto a temperaturas altas e com elevado teor de umidade, possui uma baixa viscosidade [83]. Estas propriedades reológicas estão relacionadas com a textura. Esta propriedade é testada num reómetro onde o disco de compressão exerce uma força sobre a superfície da amostra, obtendo-se

assim o valor da viscosidade e o pico de máxima força revela-nos o valor da firmeza da amostra (**Figura 8**).

Relativamente ao comportamento de escoamento, os fluídos podem ser classificados em Newtonianos e não-Newtonianos [82]. Um fluído apresenta um comportamento considerado newtoniano quando apresenta uma viscosidade constante que depende da variação da temperatura, ou seja, apresentam uma relação linear entre a taxa de deformação e a tensão de corte. Para um fluído não-Newtoniano, a tensão de corte não é proporcional a taxa de deformação, ou seja, a viscosidade do material não é constante, podendo ser classificados em dois grupos, independentes do tempo e dependentes do tempo [82,84]. No caso dos méis, a grande maioria comporta-se como um fluido Newtoniano [81]. No entanto, existem algumas exceções descritas na literatura, como é o caso do mel de urze (*Calluna vulgaris*) que apresenta um comportamento tixotrópico, enquanto alguns méis de eucalipto (*Eucalyptus fisiifolia*) se comportam como fluidos dilatantes.

### 2.6.11. Mel: alimento e saúde

O mel é um alimento natural, muito energético e consumido em todo o mundo, tendo um grande impacto na nutrição humana. Na antiguidade, o mel era usado para fins medicinais tendo assumido mais tarde um papel importante no tratamento de feridas crónicas, queimaduras, como um agente antimicrobiano, inflamações orofaríngeas, úlceras gástricas, utilizado como calmante, estimulante do sistema imunitário entre outros [85].

O mel apresenta na sua composição um grande número de compostos que lhe conferem propriedades bioativas, entre as quais, atividade antioxidante, atividade anticancerígena, anti-inflamatória, anti teratogénica, analgésica, antibacteriana [86, 87]. Em estudos recentes verificou-se que o mel de *Erica* sp. apresenta benefícios no o tratamento de infeções, como inflamações da garganta ou da membrana mucosa da cavidade oral, em infeções urinárias Além do mais, também se verificou a inibição de várias bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, entre outras e algumas leveduras do género *Candida* spp. [88, 89].

## 2.7. Mel de urze

A urze é o nome comum dado a várias plantas da família Ericaceae, comuns nas formações vegetais das zonas silícicas da Península Ibérica. Estas plantas, (Figura 9). podem ser encontradas nas zonas mais altas das serras, o que as torna um recurso valioso para as abelhas em áreas muito e pouco interesse agrícola e florestal, onde os solos são pobres e a vegetação é escassa. As espécies de urze mais representativas em Portugal e fontes principais para o néctar destes méis são as espécies *Erica arborea* (urze branca), *Erica australis*. (urze vermelha) e *Erica umbellata*. A espécie de urze *Calluna vulgaris*, embora sendo uma das principais origens botânicas dos méis de urze, encontra-se em menor quantidade nos solos portugueses, [90,91] ocorrendo em maior abundância nos méis de urze de Espanha e França [92].



**Figura 9** - Abelha recolhendo néctar de *Erica australis* (urze vermelha).

(Foto de Luís Miguel Moreira)

Em Portugal, a floração das ericáceas ocorre em duas épocas, com início no mês de março e prolongando-se até Julho [25], sendo muito apreciadas pelas abelhas pela sua produção de néctar. Em zonas de clima mediterrânico seco, que geralmente corresponde a planaltos da zona centro e sul de Portugal, a floração inicia-se na primavera, podendo estender-se ao longo da Primavera e Verão. Nestas zonas, a produção de méis monoflorais de urze é mais difícil (mínimo 45% de pólen de *Erica sp*), pois o néctar recolhido pelas abelhas é normalmente consumido pelas abelhas durante o seu período de desenvolvimento. O néctar de urze recolhido no verão é o que se encontra em maior quantidade no mercado como mel monofloral, proveniente da região centro ou norte de Portugal.

O mel de urze é bastante apreciado pelos consumidores em Portugal e na Europa Central em particular por ser um mel mais escuro, de aroma intenso e persistente, com um gosto ligeiramente amargo que depende da espécie de urze [85]. É um mel intensamente mineralizado e rico em compostos fenólicos pelo que possui uma maior capacidade antioxidante [57].

# Capítulo II



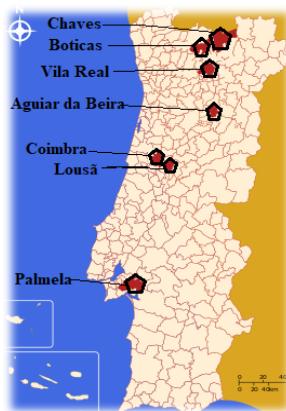
## Material e Métodos



### 3. Material e métodos

#### 3.1. Amostragem

O presente trabalho, incluiu a análise de doze amostras comerciais de mel com indicação no rotulo como monoflorais de urze provenientes de sete regiões geográficas de Portugal (**Figura 10**), produzidas entre 2015 e 2016.



**Figura 10-** Origem geográfica das amostras de mel [93].

Na **Tabela IV**, encontra-se a informação relativamente às amostras de mel usadas ao longo deste trabalho, nomeadamente a sua origem geográfica, ano de produção e outras informações relevantes no rótulo. Todas as amostras de mel foram conservadas à temperatura ambiente, nas embalagens de origem e ao abrigo da luz solar, até serem analisadas

**Tabela IV-** Origem geográfica e outras informações das amostras de mel.

Amostras	Origem geográfica	Outras informações no rótulo
A0	Coimbra	-
A1	Chaves	-
A2	Chaves	-
A3	Aguiar da Beira	-
A4	Aguiar da Beira	-
A5	Vila Real	Mel biológico
A6	Boticas	Mel DOP
A7	Palmela	-
A8	Lousã	-
A9	Lousã	Mel biológico
A10	Boticas	Mel DOP
A11	Boticas	Mel DOP- Best Selection

### 3.2. Análise do mel

A caracterização das amostras de mel foi realizada através da identificação da sua origem floral por análise polínica e pela avaliação dos parâmetros físico-químicos e bioquímicos, definidos pela *International Honey Commission* (IHC) [31]. Para além destes parâmetros, procedeu-se ainda à avaliação da composição em compostos fenólicos, compostos voláteis, atividade antioxidante e propriedades reológicas.

#### 3.2.1. Análise polínica

Para a análise do pólen, dissolveram-se, em triplicado, 10 g de mel de cada amostra em água destilada e centrifugou-se a 4300 rpm (3373 g) durante 10 min. O sedimento obtido foi novamente dissolvido em água e centrifugado durante 5 min. A análise qualitativa foi realizada com duas alíquotas de 100 µL do sedimento, sendo usado um mínimo de 800 grãos de pólen por amostra, que foram contados e identificados utilizando um microscópio Nikon Optiphot II com uma ampliação de 400x, ou de 1000x, quando necessário. Os resultados são expressos em percentagem de representação de cada tipo de pólen e segundo a sua frequência: I, pólen importante (3% - 15%); A, pólen acompanhante (15% - 45%); e D, pólen dominante (igual ou superior a 45%). Para a análise quantitativa, foi usada uma alíquota de sedimento de 10 µL (volume final de 2 ml) e a quantidade de grãos de pólen nas alíquotas foi quantificada por microscopia, com uma ampliação de 400x. A quantidade de grãos de pólen nas várias amostras de mel foi obtida a partir da seguinte equação (**Equação nº 1**) [94] em que, os resultados são expresso em milhares (103), arredondado para o milhar.

$$PG/10\ g = \frac{S \times nPG \times 10}{S \times a \times p} \quad (\text{Equação nº 1})$$

Esta análise foi realizada em colaboração com o Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciéncia da Universidade de Vigo, em Ourense.

#### 3.2.2. Cor

A avaliação da cor foi realizada colocando, em triplicado, as amostras de mel num banho de ultra-sons com água previamente aquecida a 45°C de modo a assegurar a

dissolução de quaisquer cristais de açúcar. De seguida, procedeu-se a calibração do aparelho com uma solução de glicerol, e avaliou-se a cor das amostras classificando-as de acordo com a escala de Pfund, através de leitura direta num colorímetro C221 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA).

### 3.2.3. Humidade

O teor em humidade foi determinado, em triplicado, através de um refratómetro, expressando-se os resultados em percentagem.

### 3.2.4. Condutividade

A condutividade foi avaliada em triplicado, sendo para isso necessário calcular a massa de amostras utilizando os valores da humidade. Preparou-se uma solução de mel, diluindo-se 20 g de mel anidro em 100 mL de água destilada, e mediu-se a respetiva condutividade elétrica com a ajuda de um medidor de condutividade Consort C868 (**Figura 11**), previamente calibrado com uma solução de cloreto de potássio (KCl) a 0,01M, a 0,1M e a 1M. Os resultados são expressos em  $\text{mS.cm}^{-1}$ .



**Figura 11** - Medidor de condutividade.

### 3.2.5. Cinzas

O teor de cinzas foi determinado, em triplicado, indiretamente através do seu cálculo, de acordo com o definido na literatura [28], a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{Cinzas} = \frac{\left( \frac{\text{condutividade}}{1000} \right) - 0,14}{1,74} \quad (\text{Equação n}^{\circ} 2)$$

### 3.2.6. pH, acidez livre e acidez lactónica

A avaliação das propriedades ácidas do mel foi realizada por três parâmetros diferentes, nomeadamente, através da leitura do valor do pH da solução inicial de mel, bem como utilizando um procedimento de titulação para o cálculo da acidez livre e acidez lactónica (**Figura 12**). A titulação foi realizada com um medidor de pH (Hanna instruments, pH 211 microprocessor pH meter) previamente calibrado com uma solução de pH 7, pH 4 e pH 9.



**Figura 12** - Medidor de acidez.

Para a identificação da acidez livre, efetuou-se o procedimento referenciado pelo IHC [31]. Inicialmente foi preparada uma solução dissolvendo 5 g de mel em 50 mL de água desionizada. De seguida, pipetou-se 25 mL desta solução para um matraz onde se colocou o elétrodo de pH, registando o valor inicial de pH, e procedendo-se de seguida à titulação da solução com hidróxido de sódio (NaOH)  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Os volumes de base gastos para atingir o ponto de equivalência (pH=7) foi registado. O valore obtido permite determinar a acidez livre que é a medida obtida pela titulação com hidróxido de sódio (NaOH) até ao ponto de equivalência (pH=7)

Para a determinação da acidez lactónica, após atingir o ponto de equivalência, completou-se a adição de base até atingir o volume final de 10 mL, efetuando-se de seguida uma retro-titulação da base em excesso com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $0,025 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  até atingir novamente o ponto de equivalência (pH=7). A diferença de NaOH gasto nas duas titulações permite calcular a acidez lactónica e a acidez total (livre + lactónica). Os resultados são expressos em  $\text{meq} \cdot \text{kg}^{-1}$  mel.

### 3.2.7. Prolina

A sua avaliação foi realizada por métodos espetrofotométricos utilizando uma solução aquosa de mel obtida por diluição de 5 g de mel num balão volumétrico de 100

mL. Para a análise colocou-se 0,5 mL da solução de mel num tubo de ensaio (amostra), 0,5 mL de água num segundo tubo (branco) e 0,5 mL de solução padrão de prolina (0,032 mg.mL<sup>-1</sup>), em triplicado, noutros tubos (padrão), juntamente com idêntico volume de água. A cada um dos 5 tubos adicionou-se 1 mL de ácido fórmico (98%) e 1 mL de solução de ninidrina (3%) e agitou-se vigorosamente durante 15 minutos. Após este tempo, os tubos foram colocados num banho de água a ferver durante 15 minutos, e posteriormente num outro banho a 70°C durante 10 minutos adicionais. No final adicionou-se 5 mL de propan-2-ol a cada tubo de ensaio e deixou-se arrefecer com os tubos fechados. Após 45 minutos efetuou-se a leitura num espetrofotómetro (Specord 200 spectrophotometer, Analytikjena, Jena, Alemanha) a uma absorvância de 510 nm. O teor de prolina no mel varia em função das suas características e para o cálculo do teor em prolina, utilizou-se a seguinte equação (**Equação nº 3**), sendo os resultados expressos em mg.kg<sup>-1</sup>, onde a absorvância do padrão foi calculada pela média dos três ensaios:

$$\text{Prolina} = (\text{Abs}_{\text{amostra}}/\text{Abs}_{\text{padrão}}) \times (\text{massa}_{\text{padrão}}/\text{massa}_{\text{amostra}}) \times 80 \quad (\text{Equação nº3})$$

### 3.2.8. Açúcares

A quantificação do teor em açúcar nas doze amostras foi realizada por cromatografia líquida acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), utilizando-se uma calibração por padrões externos. Para a análise foi preparada uma solução através da diluição de 2,5 g de mel em 20 mL de água desionizada. De seguida, pipetou-se 11,5 mL de metanol e transferiu-se a solução diluída de mel para um balão volumétrico de 50 mL, perfazendo o total do volume com água desionizada. Posteriormente, a amostra foi filtrada em filtros de nylon de 0.2 µm antes de se injetar no cromatógrafo. O sistema de cromatografia utilizado foi constituído por uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer Smartline 2300). A análise de dados foi realizada com o software Clarity 2.4 (DataApex). Para a separação cromatográfica foi usada uma coluna 100-5 NH<sub>2</sub> Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30°C (forno Grace 7971 R). Como fase móvel utilizou-se uma mistura de acetonitrilo/água 80:20 (v/v), com um caudal de 1,3 mL.min<sup>-1</sup>. A identificação dos açúcares foi obtida por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões, nomeadamente, frutose, glucose,

## Capítulo II– Material e métodos

sacarose, turanose, maltulose, maltose, trealose, melezitose, rafinose, melibiose, erlose, isomaltose e kogibiose. Para cada um destes padrões foi estabelecida uma reta de calibração pelo método de padrões externos, utilizando-se uma gama de concentrações de acordo com os níveis esperados para cada açúcar (**Tabela V**). Os valores obtidos pelas amostras foram calculados a partir da área dos picos e são apresentados em g/100 g de mel. A análise do perfil de açúcares foi também considerada em termos de relação frutose+glucose, frutose/glucose e glucose/água, com o objetivo de aferir a tendência à cristalização dos méis.

**Tabela V** - Intervalo de concentrações referente a cada padrão, respetivos coeficientes de correlação e retas de calibração.

Açúcares padrão	Intervalo de concentrações (mg.mL <sup>-1</sup> )	Equação da reta de calibração	R <sup>2</sup>
Frutose	3,75 - 60	Y=153,07x + 38,905	0,9996
Glucose	1,81 - 45	Y=119,66x - 81,919	0,9994
Sacarose	0,93 - 15	Y=154,68x + 1,613	0,9997
Turanose	0,28 - 4,5	Y=135,18x + 1,0489	0,9996
Malulose	0,28 - 4,5	Y=154,85x - 5,333	0,9904
Maltose	0,28 - 4,5	Y=85,487x - 17,581	0,9989
Trealose	0,28 - 4,5	Y=145,94x - 7,7245	0,9994
Melizitose	0,28 - 4,5	Y=22,329x - 2,3994	0,9996
Rafinose	0,28 - 4,5	Y=119,13x + 9,7327	0,9992
Melibiose	0,28 - 4,5	Y=108,3x - 2,7603	0,9997
Isomaltose	0,32 - 5,1	Y=42,552x - 1,8933	0,9999
Kogibiose	0,08 -1,35	Y=95,399x + 1,8282	0,9981
Erlose	0,15 - 2,5	Y=36,292x - 0,034	0,9997

### 3.2.9. 5-Hidroximetilfurfural

A análise do teor em 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), foi realizada por espetrofotometria. Foram preparadas duas soluções através da dissolução de 5 g de mel em 25 mL de água destilada. As soluções foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, aos quais se adicionaram 0,5 mL de solução Carrez I e 0,5 mL de solução Carrez II, perfazendo o volume total com água destilada. De seguida filtrou-se a solução e desprezaram-se os primeiros 10 mL de filtrado, de seguida recolheram-se duas alíquotas de 5 mL para dois tubos de ensaio. A um dos tubos adicionou-se 5 mL de água destilada

(amostra) e ao outro 5 mL de uma solução de bissulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ) 0,2% (branco), posteriormente efetuou-se a leitura da absorvância a 284 e 336 nm num espetrofotômetro (Specord 200 spectrophotometer, Analytikjena, Jena, Alemanha).

O valor de HMF é expresso em  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  e determinado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{HMF} = (\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336}) \times 149,7 \times (5/\text{massa amostra}) \quad (\text{Equação n}^{\circ} 4)$$

### 3.2.10. Índice diastásico

A avaliação da atividade diastásica foi efetuada pelo método Phadebas [31]. Este método espetrofotométrico é realizado através da preparação de uma solução aquosa de mel obtida pela diluição de 1 g de mel num balão volumétrico de 100 mL. Após a preparação da solução, transferiu-se 5 mL para um tubo de ensaio e colocou-se num banho a 40°C, juntamente com um segundo tubo (branco) contendo os mesmos 5 mL mas de uma solução tampão acetato 0,1 M (pH 5,2). De seguida colocaram-se as pastilhas Phadebas nos dois tubos que, após agitação, foram mantidos a 40°C por 15 minutos adicionais. Após este tempo adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 0,5 M, filtrou-se e registou-se a absorvância a 620 nm num espetrofotômetro (Specord 200 spectrophotometer, Analytikjena, Jena, Alemanha). O resultado é apresentado como índice diastásico (DN), em unidades Schade, correspondendo uma unidade de diastase à atividade enzimática de 1g de mel capaz de hidrolisar numa hora 0,01 g de amido a 40°C. As fórmulas usadas para calcular o valor de DN foram as seguintes:

$$\text{DN} = 28,2 * \text{Abs}_{620} + 2,64, \text{ se } \text{DN} > 8 \quad (\text{Equação n}^{\circ} 5)$$

$$\text{DN} = 35,2 * \text{Abs}_{620} - 0,46, \text{ se } \text{DN} < 8 \quad (\text{Equação n}^{\circ} 6)$$

### 3.2.11. Parâmetros nutricionais

#### 3.2.11.1. Proteínas

Para a determinação das proteínas foi aplicado o método Kjeldahl, que consiste na determinação indireta, baseando-se na quantificação do azoto orgânico total. Esse processo iniciou-se com a digestão de 1g de mel por adição de ácido sulfúrico e de um

catalisador metálico que acelera o processo de oxidação da matéria orgânica num digestor a 400°C durante 90 minutos. Após a degradação da amostra e transformação do azoto em sulfato de amónio segue-se um processo de neutralização, de destilação e finalmente a titulação do amoníaco libertado. Para a conversão do teor de azoto em proteína total utilizou-se um fator de 6,25, exprimindo-se os resultados em g/100g de mel.

### 3.2.11.2. Hidratos de carbono

O teor em hidratos de carbono das amostras de mel foi obtido por cálculo diferencial considerando a seguinte expressão definida na literatura: [95].

$$\% \text{Hidratos Carbono} = 100 - \% \text{humidade} - (\% \text{ cinzas} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lípidos})$$

(Equação nº 7)

### 3.2.11.3. Energia

O valor energético expresso em kcal, foi calculado em 100g de mel, através da seguinte equação: [10].

$$\text{Valor energético (kcal/100g)} = 4 \times (\% \text{ proteína} + \% \text{ hidratos de carbono}) + 9 \times (\% \text{ lípidos})$$

(Equação nº 8)

## 3.2.12. Conteúdo em fenóis totais

Para a determinação do teor em fenóis totais foi aplicado o método de Folin-Ciocalteu, descrito na literatura [57], com algumas modificações. Inicialmente foi preparada uma solução pesando 1 g de mel em 10 mL de metanol (MeOH). De seguida, a uma alíquota (0,5 mL) desta solução foi adicionado 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e, após 3 minutos, 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (10% w/v), ajustando-se o volume final para 5 mL com água desionizada. A solução final foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, durante 1 hora medindo-se a absorvância a 700 nm, num espetrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento usando 0,5mL de MeOH em detrimento da

amostra. O ácido gálico (GA) foi utilizado como padrão numa gama de concentrações entre 0,005 - 0,15 mg.mL<sup>-1</sup>, obtendo-se a seguinte curva de calibração ( $y=8,0586x+0,0027$ ;  $R^2=0,992$ ). Os resultados finais do conteúdo em fenóis totais foram expressos em mg EAG.g<sup>-1</sup> de mel, onde EAG representa unidades equivalentes em ácido gálico.

### 3.2.13. Atividade antioxidante

#### 3.2.13.1. Efeito bloqueador de radicais livres DPPH

A capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) foi avaliada, em triplicado, de acordo com a metodologia descrita na literatura, com algumas modificações [96]. Para tal, numa placa de 96 poços, misturou-se 10 µL de extrato metanólico da amostra, com diferentes concentrações (0,003 - 0,03 mg.mL<sup>-1</sup>), com 0,15 mL de uma solução metanólica contendo os radicais de DPPH (0,060 mM). Após 60 minutos no escuro, à temperatura ambiente, a redução da concentração do radical de DPPH foi medida pela monitorização do decréscimo da absorvância a 515 nm num leitor de microplacas (ELX800 Microplate Reader Bio-Tek Instruments, Inc.). O efeito bloqueador de radicais de DPPH foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, usando a seguinte equação (**Equação nº 9**), em que Abs<sub>A</sub> corresponde à absorvância da solução com o extrato da amostra e Abs<sub>DPPH</sub> à absorvância inicial da solução de DPPH.

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(Abs_{DPPH} - Abs_A) / Abs_{DPPH}] \times 100 \quad (\text{Equação nº 9})$$

Os resultados foram expressos através do valor EC<sub>50</sub>, correspondendo à concentração de extrato que bloqueia 50% dos radicais de DPPH presentes na solução inicial [97]. Para comparação foi usada uma solução padrão de ácido gálico cujo valor médio de EC<sub>50</sub> é de 1,22 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.13.2. Poder redutor

Para avaliar o poder redutor aplicou-se a metodologia descrita na literatura [96], com algumas modificações. Assim, misturou-se 15  $\mu$ L de uma solução de mel com uma concentração de 0,005 g.mL<sup>-1</sup> com 1,25 mL de uma solução de tampão fosfato com pH 6,6 e com 1,25 mL de ferrocianeto de potássio tri-hidratado 0,2 M. Após a adição, a mistura foi agitada vigorosamente e incubada a 50 °C durante 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 1,25 mL de ácido tricloroacético (a 10%) seguindo-se um processo de centrifugação a 1000 rpm, durante 8 minutos (Centorion K24OR-2003). No final retirou-se 1,25 mL do sobrenadante, e adicionou-se 1,25 mL de água destilada e 0,25 mL de cloreto férlico a 0,1%. De seguida, efetuou-se a leitura da absorbância a 700 nm num espetrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Como padrão foi utilizada uma solução de ácido gálico num intervalo de concentrações de 0,001 a 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> ( $y=46,415x-0,0275$ ;  $R^2=0,993$ ). Os resultados do poder redutor das amostras de mel analisadas foram expressos em mgEAG.g<sup>-1</sup> de mel, onde EAG representa unidades equivalentes em ácido gálico.

## 3.2.14. Compostos fenólicos

### 3.2.14.1. Extração

Para a quantificação e determinação dos compostos fenólicos, as amostras de mel foram extraídas, em triplicado, pesando-se 100g de mel em 500mL de água acidificada (pH=2, HCl). De seguida filtrou-se a solução com algodão para remover quaisquer partículas sólidas. O filtrado obtido foi passado por uma coluna Amberlite XAD-2, que tem a capacidade de reter os compostos fenólicos de uma forma seletiva. Para remoção dos açúcares e outros compostos polares efetuou-se uma lavagem com passagem de água acidificada a pH=2. Posteriormente, a fração fenólica foi eluída com metanol e concentrou-se o extrato sob pressão reduzida, a 40°C. O resíduo final foi depois redissolvido em 5mL de água destilada e sujeito a uma extração líquido/líquido, utilizando como solvente extrator, o éter dietílico. O processo de extração é repetido três

vezes. Por fim os extratos de éter foram combinados e concentrados sob pressão reduzida, sendo o resíduo final dissolvido em metanol e analisado por UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>.

### 3.2.14.2. Análise por UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>

As análises de UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> foram realizadas num equipamento Dionex UPLC final 3000 (Thermo Scientific, EUA) (**Figura 13**) equipado com um detetor de fotodíodos e acoplado a um detetor de massas. O sistema cromatográfico consistiu uma bomba quaternária, um amostrador automático mantido a 5°C, um desgaseificador, um detetor de matriz de fotodíodos e um compartimento de coluna termostática automática. A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna U-VDSpher PUR C18-E 100 mm x 2,0 mm i.d., com um tamanho de partícula de 1,8 µm (VDS Optilab, Alemanha) e mantida a 30°C. A fase móvel foi composta por (A) 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água e (B) 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrilo, previamente desgaseificados e filtrados usando um filtro de membrana nylon com porosidade 0,22 µm.



**Figura 13** - Equipamento de UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>.

Para a corrida utilizou-se um gradiente linear com um caudal de 0,3 mL·min<sup>-1</sup>: 0,0-1,0 min 20% de B; 1,0-11,1 min 20-95% (B); 95% (B) durante 2 min; 13,1-13,3 min 95-20% (B); e 20% (B) durante 5 min. O volume de injeção foi de 3 µl. Os dados espectrais de todos os picos foram detetados na gama de 190-600 nm. Cada amostra foi filtrada através de uma membrana de nylon 0,2µm (Whatman). A análise de massas foi realizada num espectrómetro de massa LTQ XL (Thermo Scientific, CA, EUA), em modo negativo, equipado com uma fonte de ionização por electro-spray ESI: tensão do spray, 5 kV; voltagem do capilar, -20V; tensão do tubo capilar, -65V; temperatura do capilar, 325°C; fluxo de gás e gás auxiliar (N<sub>2</sub>), 50 e 10 (unidades arbitrárias), respetivamente. Os espectros de massa foram adquiridos no intervalo de massa de 100-1000 *m/z*. A energia

de colisão utilizada nas experiências de MS<sup>n</sup> foi de 35 (unidades arbitrárias). A aquisição de dados foi realizada através do software Xcalibur<sup>®</sup> (Thermo Scientific, CA, E.U.A.). A quantificação foi efetuada com curvas de calibração de substâncias padrão para o ácido cafeíco ( $y=2x10^7x-427,68$ ;  $R^2=0,999$ ), quercetina ( $y=1x10^7x-102221$ ;  $R^2=0,999$ ), caempferol ( $y=1x10^7x-364751$ ;  $R^2=0,983$ ), crisina ( $y=6x10^6x-42057$ ;  $R^2=0,999$ ) e pinocembrina ( $y=1x10^7+163378$ ,  $R^2=0,985$ ). Quando os padrões que não se encontravam disponíveis, os compostos foram expressos por equivalentes do composto fenólico estruturalmente mais semelhante. A elucidação da estrutura dos compostos fenólicos foi realizada por comparação do seu comportamento cromatográfico, espectros de UV e perfil de massa com o obtido para padrões comerciais e também com a informação obtida na literatura quando estes não estavam disponíveis.

### 3.2.15. Análise de compostos voláteis

#### 3.2.15.1. Microextração em fase sólida (SPME)

Introduziu-se 7,5 g de amostra de mel num vial de 20 mL, adicionando-se 7,5 mL de uma solução de cloreto de sódio a 30%. Após colocação de um agitador magnético, a amostra foi agitada até à sua completa dissolução, tendo o vial sido selado e colocado, sob agitação, num banho termostatizado a 50 °C (**Figura 14**).



**Figura 14-** Extração de compostos voláteis por SPME.

Para a extração e posterior análise dos compostos voláteis por SPME foi utilizada uma fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) com 65 µm de espessura (Supelco SPME fiber 57326U). A fibra foi introduzida no vial e exposta no espaço-de-cabeça sob a amostra durante 60 minutos. Após este período, a fibra foi recolhida e

colocada no injetor do cromatógrafo de fase gasosa (GC) para desorção térmica dos compostos, durante 5 min.

### **3.2.15.2. Análise cromatográfica por GC-MS**

A análise dos compostos voláteis previamente extraídos por SPME foi efetuada por GC-MS (sistema Perkin Elmer com um módulo de GC Clarus® 580 GC e um modulo MS Clarus® SQ 8 S). A injeção efetuou-se em modo splitless e a desorção da fibra decorreu durante 5 min a 250 °C. Os compostos foram separados numa coluna DB-5MS (30 m x 0,25mm i.d., espessura 0,25µm; J & W Scientific, Inc.). A temperatura do forno foi programada de 40 °C a 170 °C (a 3 °C/min), de 170 °C a 290 °C (a 25 °C/min), mantendo-se a 290 °C durante 15 min. O hélio foi usado como gás de arrasto a uma velocidade constante de 40 cm.s<sup>-1</sup>. O espectro de massa foi adquirido com uma energia de ionização de 70 eV. A temperatura da linha de transferência e da fonte de ionização foi de 250 °C e 230 °C, respetivamente. O software Turbomass foi usado na aquisição de dados. Para a identificação dos compostos, compararam-se os resultados obtidos com os obtidos para padrões comerciais e também através de uma libraria MS de compostos (NIST), confirmando-se através dos índices lineares de retenção (LRI). Para o cálculo dos índices LRI foi usada uma mistura de alcanos de n-heptano a n-tetracontano (Supelco, Bellefonte, PA, USA) dissolvida em hexano. Os valores das áreas relativas (percentagem de voláteis total) foram obtidos diretamente da corrente de iões totais (total ion chromatogram, TIC).

## **3.2.16. Caracterização reológica**

### **3.2.16.1. Viscosidade**

As amostras de mel (25 mL), foram colocadas num banho termostatizado à temperatura de 25°C, 35°C ou 45°C. Após atingir a temperatura desejada, a viscosidade das amostras foi registada, utilizando um viscosímetro rotacional (Myr V1-L), que possui diferentes *spindles* (L1, L2, L3 e L4). Foram realizadas as leituras da viscosidade escolhendo o *spindle* L4 e a gama de velocidades de rotação do mesmo, mais adequados à amostra.

### 3.2.16.2. Textura

A avaliação da coesividade, consistência, firmeza e índice de viscosidade das amostras de mel foi realizada num analisador de textura Stable Micro Systems (TA-XT Plus), previamente calibrado, e equipado com uma sonda acoplada de um disco de compressão de 40 mm que imprime uma força sobre um recipiente de diâmetro 50 mm (**Figura 15**).



**Figura 15** - Texturómetro.

Antes da sua análise, as amostras de mel foram colocadas, num banho de ultrassons para dissolver cristais e remover bolhas de ar que pudessem interferir nos resultados da avaliação reológica. O equipamento operou a uma altura de 100 mm (a coluna de mel tinha 80mm e ocupava cerca de 75% do volume total do recipiente). Após iniciar o seu movimento, o disco de compressão exerce uma força sobre a superfície da amostra durante um curto período de tempo (aproximadamente 2 segundos) e desce a uma profundidade de 20 mm, a uma velocidade constante, usando uma velocidade de retorno de  $20 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  até voltar à superfície da amostra.

# Capítulo III



## Resultados e Discussão



---

## Resultados e discussão

### 4. Parâmetros de avaliação da qualidade do mel

Tradicionalmente o mel é considerado o produto primário mais importante da apicultura, sendo considerado um alimento nutracêutico. Cada vez mais tem sido necessário efetuar um rigoroso controlo da qualidade de produtos alimentares, particularmente do mel.

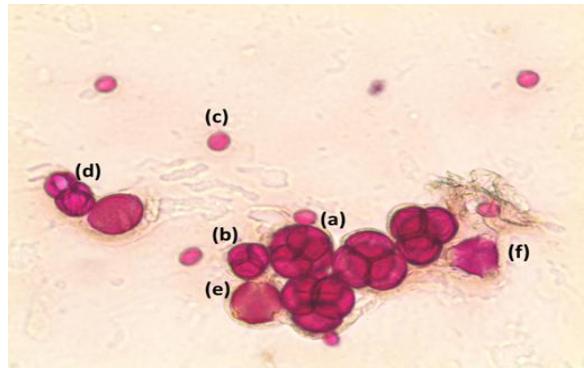
A avaliação e caracterização das doze amostras de mel de urze (*Erica* sp.) é efetuada tendo em conta parâmetros de qualidade. Para isso avaliaram-se os parâmetros físico-químicos que se basearam na (humidade, pH, acidez, condutividade, cor, HMF, índice diastásico, prolina, e composição fenólica), análise polínica do mel, os parâmetros nutricionais (proteínas, hidratos de carbono, teor em cinzas e energia) a atividade antioxidante (poder redutor e bloqueador de radicais livres), o perfil em açúcares, os compostos voláteis e as propriedades reológicas (textura e viscosidade).

#### 4.1. Análise polínica

A identificação da flora melífera visitada pelas abelhas é de extrema importância, uma vez que nos permite realizar um levantamento polínico qualitativo e quantitativo das amostras de mel através da técnica de melissopalinologia e assim construir o seu espectro polínico [98]. A designação de mel multifloral é atribuída a méis que possuem na sua composição percentagens de pólen provenientes de várias espécies florais, enquanto que a designação de mel monofloral é utilizada para caracterizar méis obtidos a partir de uma única espécie de planta (pelo menos 45% desse pólen) embora este valor possa variar de acordo com a capacidade que a planta tem para produzir pólen [57].

A análise polínica das várias amostras de mel evidenciou a presença de uma grande quantidade de pólen, com valores a variar entre 36750 e 137500 grão de pólen por 10g de mel. Na totalidade das amostras, foram identificados 43 tipos de pólen, em que os mais frequentes são sumariados na **Tabela VI**. As famílias botânicas mais frequentemente encontradas foram as *Fagaceae*, *Rosaceae*, *Ericaceae* e *Leguminosae*. O pólen de *Erica* estava presente em 10 amostras, numa percentagem entre 1,2 % e 46,6%, com a amostra A11 proveniente da região de Boticas a apresentar o maior valor. Também foram

encontrados em grandes percentagens os pólenes de *Castanea sativa* e *Rubus*, com percentagens a variar entre 1,2% e 73,8% e 7,1% e 42,2%, respetivamente. Pólenes do tipo *Cytisus*, *Echium*, do tipo *Crataegus monogyna*, *Eucalyptus*, *Salix*, *Acacia*, *Rhamnus* e *Allium* também foram encontrados, mas com uma menor frequência. Na **Figura 16**, pode-se observar algumas das famílias polínicas identificadas nas amostras.



**Figura 16** - Identificação polínica da amostra A2 : (a) *Erica umbellata*; (b) *Erica arborea*; (c) *Castanea sativa*; (d) *Rubus*; (e) *Cytisus*; (f) *Crataegus*.

Neste estudo, o pólen de *Castanea sativa* surgiu como maioritário nas amostras A1 (região de Chaves) e A4 (região Aguiar da Beira), com uma média de 73%, sendo considerados estes méis como monoflorais de castanheiro [99]. Nos méis de urze, segundo a literatura, a presença de pólen de *Erica sp.* pode ser considerada como sub-representada. Este pólen raramente atinge uma percentagem superior aos 45% necessários para ser considerado monofloral, devido à morfologia do grão de pólen e à sua dispersão característica formando tétradas (4 grãos de pólen agregados). Em méis monoflorais de urze do norte de Espanha, [100], foi encontrado um valor médio 36,7%, tendo variado num intervalo entre os 23,1% e os 49,4%. Tomando em conta estes resultados, foram considerados méis monoflorais de urze as amostras A8 (Região da Lousã) e a A10 e A11 da região de Boticas, sendo a amostra A11 a que apresenta uma maior percentagem de pólen (46,6%). Em outras amostras, como a amostra A0 (região de Coimbra), amostra A2 (Chaves), a amostra A5 (região de Vila Real) e a amostra A9 (região da Lousã) verificou-se que presença do pólen de *Erica sp* variou numa percentagem entre os 22% e os 28%. Embora esta percentagem seja, de alguma forma, significativa, para classificar estes méis como monoflorais, outros parâmetros, como a análise organoléptica e os parâmetros físico-químicos teriam de ser avaliados e correlacionados estatisticamente.

### Capítulo III - Resultados e discussão

**Tabela VI** - Características polínicas das amostras de mel analisadas.

Amostras	Origem	D	A	I
A0	Coimbra		<i>Castanea sativa</i> (29,2%), <i>Erica</i> (23%), <i>Rubus</i> (19,2%), tipo <i>Cytisus</i> (15,3%)	<i>Eucalyptus</i> (7,2%)
A1	Chaves	<i>Castanea sativa</i> (73,8%)	<i>Rubus</i> (21,5%)	-
A2	Chaves	-	<i>Castanea sativa</i> (43,6%), <i>Rubus</i> (23,6%), <i>Erica</i> (22,2%)	-
A3	Aguiar da Beira	-	<i>Rubus</i> (42,2%), <i>Castanea sativa</i> (36,5%)	<i>Echium</i> (7,6%), <i>Erica</i> (3,2%)
A4	Aguiar da Beira	<i>Castanea sativa</i> (71,3%)	<i>Rubus</i> (19,4%)	<i>Echium</i> (4,6%), <i>Erica</i> (3,0%)
A5	Vila Real	-	<i>Erica</i> (28,1%), <i>Rubus</i> (21,2%), <i>Castanea sativa</i> (18%)	tipo <i>Cytisus</i> (9,7%), <i>Echium</i> (9,1%), tipo <i>Crataegus monogyna</i> (5,2%), tipo <i>Campanula</i> (4%)
A6	Boticas	-	<i>Castanea sativa</i> (30,9%), tipo <i>Cytisus</i> (22,6%), <i>Erica</i> (18,3%)	<i>Echium</i> (11,1%), <i>Rubus</i> (6,7%)
A7	Palmela	-	tipo <i>Cytisus</i> (27,3%), <i>Rubus</i> (25,2%)	<i>Castanea sativa</i> (12,6%), <i>Eucalyptus</i> (5,8%), <i>Rhamnus</i> (4,9%), <i>Allium</i> (4,6%)
A8	Lousã	-	<i>Erica</i> (39,1%), tipo <i>Cytisus</i> (34,6%)	<i>Rubus</i> (6,3%), <i>Salix</i> (4,8%), <i>Acacia</i> (4,3%) <i>Eucalyptus</i> (3,5%)
A9	Lousã	-	tipo <i>Cytisus</i> (25,2%), <i>Erica</i> (22%), <i>Rubus</i> (18,6%)	tipo <i>Crataegus monogyna</i> (11,8%), <i>Eucalyptus</i> (7,7%), <i>Salix</i> (6,4%), <i>Acacia</i> (4,3%)
A10	Boticas	-	<i>Erica</i> (43,2%), <i>Castanea sativa</i> (24,4%), tipo <i>Cytisus</i> (19,3%)	<i>Rubus</i> (6,4%)
A11	Boticas	<i>Erica</i> (46,6%)	tipo <i>Cytisus</i> (36,9%)	<i>Rubus</i> (7,1%), <i>Castanea sativa</i> (8,9%), <i>Salix</i> (5,5%)

**Nota:** D- pólen dominante (igual ou superior a 45%); A- pólen acompanhante (15% - 45%) e I- pólen importante (3% - 15%).

## 4.2. Caracterização físico-química

### 4.2.1. Cor

A cor do mel depende de vários fatores e este parâmetro, por si só, não fornece informação relevante sobre a qualidade do mel. No entanto, é uma característica organolética que pode influenciar a decisão do consumidor na hora de comprar um determinado tipo de mel. A análise colorimétrica das amostras de mel em estudo foi efetuada através da escala de Pfund por leitura direta no colorímetro. Os resultados revelaram uma predominância cromática de âmbar escuro na maioria das amostras, com valores a variar entre os 123 e 150 mm Pfund, (**Tabela VII**), à exceção das amostras A3 e A4 de Aguiar da Beira que apresentaram uma cor âmbar claro, com valores de 80 e 79 mm Pfund respectivamente. Os valores obtidos apresentam uma variabilidade nula.

**Tabela VII** - Parâmetros físico-químicos: Cor, humidade e condutividade.

Amostras	Cor (mm Pfund)	Humidade (%)	Condutividade (mS.cm <sup>-1</sup> )
A0	150 (Âmbar escuro)	15,7	0,87
A1	150 (Âmbar escuro)	14,1	1,08
A2	145 (Âmbar escuro)	15,2	0,71
A3	80 (Âmbar claro)	15,8	0,65
A4	79 (Âmbar claro)	15,8	0,97
A5	150 (Âmbar escuro)	17,5	0,52
A6	150 (Âmbar escuro)	16,0	0,62
A7	123 (Âmbar escuro)	15,8	0,84
A8	150 (Âmbar escuro)	15,7	0,53
A9	150 (Âmbar escuro)	15,8	0,54
A10	150 (Âmbar escuro)	15,9	0,53
A11	150 ± 0 (Âmbar escuro)	15,3 ± 0,1	0,56

#### 4.2.2. Humidade

O teor de humidade é uma das características mais importantes na análise do mel, encontrando-se relacionado com diferentes fatores como a origem botânica e geográfica do néctar, o solo e condições climáticas, a estação de colheita, a intensidade do fluxo de néctar, o grau de maturação, a manipulação pelos apicultores durante o período de colheita, bem como as condições de extração, processamento e armazenamento [61]. Este parâmetro influencia outras características do mel, como por exemplo a sua viscosidade e tendência para a cristalização, a cor, o paladar, a sua solubilidade e conservação [44].

De acordo com a literatura, os teores de humidade variam, normalmente, entre 13 e 25%, sendo considerado que méis com teores de humidade acima dos 18% apresentam maior propensão a fermentar [101]. De acordo com a legislação comunitária [Diretiva 2001/110/CE, de 20 de Dezembro [23], entretanto transposta para a ordem jurídica nacional através do Decreto-Lei nº214/2003, de 18 de setembro [24], encontra-se estabelecido um valor máximo de 20% para o teor de humidade do mel, com exceção do mel de urze (*Calluna sp.*) e do mel para uso industrial, que poderão apresentar valores que podem atingir os 23%.

O teor em humidade nas amostras analisadas oscilou entre 14,1% e os 17,5%, apresentando uma variabilidade inferior a 0,1 (**Tabela VII**) respeitando o valor máximo estabelecido pelo Decreto-Lei nº214/2003 de 18 de setembro [24]. A amostra A5 proveniente de Vila Real é a que revela um teor de humidade mais alto (17,5%), em oposição, à amostra A1 proveniente de Chaves com um valor de 14,1%.

Os valores encontrados estão de acordo com o descrito para o mel de urze (*Erica sp.*) português, onde se verificaram teores de humidade a variar entre um valor médio de 15,4 e 16,3% [57]. As amostras A8 (Lousã), A10 e A11 (região de Boticas), classificadas como méis de urze apresentam valores de humidade dentro dos intervalos definidos para este mel. Para outros méis portugueses encontram-se valores a variar entre 13,52 e 19,70 % [102]. Os valores de humidade obtidos, sugerem que as amostras de mel foram extraídas de forma adequada e apresenta um grau de maturação adequado para o mel.

#### 4.2.3. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica do mel está relacionada com o teor em cinzas, com a acidez, teores de ácidos orgânicos e de proteínas [103], sendo um parâmetro importante para ajudar na identificação da origem botânica do mel, nomeadamente para a discriminação do mel de melada e mel de néctar. Os méis com valores de condutividade elétrica superiores a  $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$  são considerados méis de melada ou méis monoflorais de castanheiro, enquanto aqueles que expressam valores inferiores a  $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$  são considerados méis de néctar ou misturas de vários néctares [30].

Nas amostras de mel analisadas registaram-se valores de condutividade compreendidos entre os  $0,52 \text{ mS.cm}^{-1}$  e os  $1,08 \text{ mS.cm}^{-1}$ , apresentando uma variabilidade inferior a 0,04 (**Tabela VII**), estando estes valores de acordo com o descrito na literatura para mel de urze (*Erica sp.*) português, cujos valores variaram entre  $0,52$  e  $0,94 \text{ mS.cm}^{-1}$  e para méis portugueses, no geral, onde se verificaram valores entre  $0,46$  e  $0,88 \text{ mS.cm}^{-1}$  [104]. Oito das amostras analisadas apresentaram valores de condutividade inferiores a  $0,80 \text{ mS.cm}^{-1}$ , sugerindo tratarem-se de méis de néctar ou de mistura de néctares. Apenas em quatro das amostras analisadas (A0, A1, A4 e A7) se registaram valores de condutividade superiores a  $0,80 \text{ mS.cm}^{-1}$ . Entre estas, as amostras A1, da região de Chaves, e A4, proveniente de Aguiar da Beira, apresentaram os valores de condutividade elétrica mais elevados:  $1,08 \text{ mS.cm}^{-1}$  e  $0,97 \text{ mS.cm}^{-1}$ , respetivamente, estando estes valores relacionados com o facto de haver uma predominância de pólen de castanheiro nestas amostras. De facto, a legislação indica que o mel de flores de castanheiro e misturas desses méis deverão apresentar valores de condutividade superiores a  $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$ . Esta característica dos méis monoflorais de castanheiro tem sido frequentemente reportada em diversos estudos [46,105]. Relativamente às amostras A0 e A7, uma vez que não se tratam de méis monoflorais de castanheiro, poderemos estar na presença de méis com mistura de mel de castanheiro. Para serem considerados méis de melada, de acordo com a legislação e com alguns estudos [102,105], estes méis apresentam valores de condutividade superiores a  $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$ .

#### 4.2.4. pH e acidez

A acidez é uma importante característica do mel responsável pela sua estabilidade e conservação, impedindo o desenvolvimento de microrganismos, e também pelo seu

---

sabor. A acidez livre do mel é resultado da presença de ácidos orgânicos em equilíbrio com as lactonas correspondentes, ésteres e alguns iões inorgânicos como fosfatos, sulfatos e cloreto [46].

A avaliação das propriedades ácidas do mel é realizada por três parâmetros diferentes, através da leitura do valor do pH da solução inicial e pelos cálculos da acidez livre e acidez lactónica. A acidez livre é a medida obtida da titulação com hidróxido de sódio até o ponto de equivalência pH=7. A acidez lactónica é obtida pela adição de um excesso de hidróxido de sódio que é titulado com ácido clorídrico. A determinação da acidez total é obtida pelo somatório da acidez livre e lactónica. Embora o *Codex Alimentarius* [30] não estabeleça um limite para o valor de pH no mel, ele deverá situar-se entre 3,2 e 4,5 para assim inibir a maioria dos microrganismos [104].

As amostras de mel estudadas apresentaram valores de pH compreendidos entre 3,8 e 4,5 (**Tabela VIII**), com uma variabilidade inferior a zero e em concordância com os valores encontrados frequentemente para o mel, e que revelam um caráter ácido [54]. Os resultados para a acidez livre, determinada no ponto de equivalência (pH=7), variaram entre 22,3 e 45,0 meq.kg<sup>-1</sup>, encontrando-se dentro do limite de 50 meq.kg<sup>-1</sup>, definido para o mel em geral na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro) [24]. A amostra A1, proveniente da região de Chaves, e a A0 da região de Coimbra, apresentaram os maiores valores de acidez livre: 41,0 e 45,0 meq.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas amostras de mel, descritas como monoflorais de castanheiro presentaram também os valores de condutividade mais elevados (**Tabela VII**), sugerindo assim o possível contributo de espécies responsáveis pela acidez do mel para a sua condutividade. A amostra A4 (região de Aguiar da Beira), que também tinha exibido uma elevada condutividade, registou um valor de acidez livre inferior ao das amostras A1 e A0, indicando que, para estas amostras, a condutividade poderá ter um maior contributo de outras espécies químicas, como por exemplo matéria inorgânica. Para a acidez lactónica os valores variaram entre os 10,6 e 24,1 meq.kg<sup>-1</sup> (**Tabela VIII**). Todas as amostras apresentam valores de acidez próximos do limite máximo estipulado, o que se reflete nos valores de acidez total entre 32,9 meq.kg<sup>-1</sup> e 66,1 meq.kg<sup>-1</sup>, (**Tabela VIII**).

Os valores de acidez livre das amostras de mel estudadas estão de acordo com os valores reportados em diversos estudos. Em alguns estudos efetuados em mel de urze (*Erica* sp.) português descrevem-se valores de acidez livre a variar entre 21,9 e 45,2

meq.kg<sup>-1</sup> [104]. Para outros tipos de méis portugueses, encontraram-se estudos que registaram valores de acidez livre que variam entre 16,0 e 32,0 meq.kg<sup>-1</sup> [106], para acidez total destes méis encontraram-se valores a variar entre 17,0 e 51,5 meq.kg<sup>-1</sup> [102].

**Tabela VIII** - pH e acidez das amostras de mel analisadas.

Amostras	pH inicial	Livre a pH=7 (meq.kg <sup>-1</sup> )	Lactónica (meq.kg <sup>-1</sup> )	Total (meq.kg <sup>-1</sup> )
A0	3,9	41,0 ± 3,4	24,1 ± 1,5	65,1 ± 3,0
A1	4,2	45,0 ± 2,0	21,2 ± 1,4	66,1 ± 2,8
A2	4,1	33,8 ± 0,2	22,4 ± 0,3	56,2 ± 0,2
A3	3,8	38,9 ± 3,8	20,2 ± 2,7	59,1 ± 1,1
A4	4,2	22,5 ± 0,7	21,8 ± 0,6	44,3 ± 1,3
A5	4,2	22,3 ± 0,2	10,6 ± 1,2	32,9 ± 1,1
A6	4,1	34,3 ± 0,7	17,1 ± 1,8	51,4 ± 1,4
A7	4,5	34,6 ± 0,5	12,3 ± 0,8	47,0 ± 0,5
A8	4,1	30,5 ± 3,7	11,5 ± 1,1	42,0 ± 4,2
A9	4,1	26,1 ± 0,3	12,0 ± 0,4	38,2 ± 0,3
A10	4,0	32,8 ± 0,5	14,1 ± 0,2	47,0 ± 0,5
A11	4,0	31,3 ± 3,8	13,1 ± 1,7	44,3 ± 4,3

#### 4.2.5. 5-Hidroximetilfurfural

O teor em 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) é considerado um indicador de qualidade no mel, pois a sua presença é indicativa da sua deterioração. O 5-HMF está praticamente ausente do mel após o processo de extração, no entanto, durante o processamento envolvendo tratamentos térmicos e armazenamento prolongado a sua concentração tende a aumentar de forma gradual, devido a reações de degradação de açúcares, como a glucose e frutose, em meio ácido [107,108] e reações de Maillard que ocorrem entre açúcares redutores e alguns resíduos de aminoácidos [99]. A formação de 5-HMF é influenciada por diversos fatores, nomeadamente as temperaturas, o envelhecimento, as condições de armazenamento, o pH, o perfil em açúcares, a presença de ácidos orgânicos e a origem floral [109]. A União Europeia através da Diretiva 2001/101/CE, 20 de Dezembro [23], transposta para o regime jurídico nacional através do Decreto-Lei nº 214/2003, de 18 de setembro [24], estabelece um limite máximo para o HMF de 40 mg.kg<sup>-1</sup>, com exceção

para os méis com origem em países ou regiões tropicais, onde o valor máximo poderá atingir os 80mg.kg<sup>-1</sup>

Os valores de 5-HMF observados nos méis analisados oscilaram entre 1,0 mg.kg<sup>-1</sup> e os 66,3 mg.kg<sup>-1</sup>, (**Tabela IX**). Com a exceção da amostra A6, proveniente de Boticas, que apresentou o valor de 66,3 mg.kg<sup>-1</sup>, as restantes amostras apresentam valores abaixo do estabelecido (< 40 mg.kg<sup>-1</sup>). O valor elevado de 5-HMF registado na amostra A6 poderá dever-se a diferentes fatores, entre os quais, um mau armazenamento da amostra, a uma exposição a altas temperaturas, ou poderá também ser indicativo da falsificação por adição de xarope invertido [110]. As amostras classificadas como mel monofloral de urze (A8, A10 e A11) apresentaram concentrações de 5-HMF compreendidas entre 13,9 e 26,1 mg.kg<sup>-1</sup> (**Tabela IX**), o que está de acordo com valores descritos em alguns estudos para este tipo de mel: 0,9 e 22,8 mg.kg<sup>-1</sup> [104]. Da mesma forma, as restantes amostras apresentaram valores em linha com o registado em outros estudos de méis portugueses: 1,5 e 28,6 meq.kg<sup>-1</sup> [111].

**Tabela IX** - Parâmetros físico-químicos do mel: 5-HMF, índice diastásico e prolina.

Amostras	5-HMF (mg.kg <sup>-1</sup> )	Índice Diastásico (DN)	Prolina(mg.g <sup>-1</sup> )
A0	29,8 ± 2,5	14,1 ± 0,9	1,48 ± 0,02
A1	6,9 ± 0,3	17,3 ± 0,1	1,29 ± 0,06
A2	11,2 ± 0,1	15,0 ± 0,1	0,98 ± 0,04
A3	1,5 ± 0,3	18,3 ± 0,6	0,91 ± 0,02
A4	1,2 ± 0,2	18,0 ± 2,3	1,33 ± 0,09
A5	13,9 ± 3,5	18,7 ± 0,6	0,91 ± 0,03
A6	66,3 ± 3,9	11,5 ± 0,3	0,93 ± 0,12
A7	1,0 ± 0,0	15,7 ± 0,0	1,31 ± 0,13
A8	26,1 ± 1,7	15,8 ± 0,6	0,89 ± 0,02
A9	20,4 ± 1,6	16,1 ± 0,8	0,82 ± 0,09
A10	13,9 ± 0,2	17,0 ± 5,7	0,53 ± 0,22
A11	16,9 ± 4,9	16,2 ± 0,2	1,23 ± 0,15

#### 4.2.6. Índice diastásico

A diastase é um conjunto de enzimas ( $\alpha$  e  $\beta$ -amilase) secretadas pela abelha no mel, normalmente utilizada como indicadora de envelhecimento do mel uma vez que estas possuem uma elevada sensibilidade ao calor. De acordo com a Diretiva europeia [23], estipulou-se o teor mínimo de atividade diastásica para os méis em geral de 8 unidades de Schade (DN), e um teor mínimo de 3 DN para méis com baixo teor em enzimas naturais.

Na (**Tabela IX**) podemos verificar que os valores para o conteúdo enzimático das amostras em estudo variam entre os 11,5 e 18,7 DN. A amostra A6, proveniente de Boticas, é a que apresenta um índice diastásico mais baixo o que, em conjunto com o facto de ter apresentado o teor de 5-HMF mais elevado, parece indicar a ocorrência de uma ligeira fermentação, resultante de um possível processo de aquecimento ou de um armazenamento menos adequado. Apesar de tudo, os valores registados para as amostras analisadas estão de acordo com a legislação portuguesa (mínimo de 8,0 DN) e com os valores descritos em estudos anteriores efetuados em méis monoflorais de urze (*Erica* sp.) de Portugal, onde se verificaram valores entre 10,0 e 30,0 DN [104]. Estudos realizados com outros méis portugueses revelaram teores de 5-HMF a variar entre 10,0 e 25,0 DN [111].

#### 4.2.7. Prolina

A prolina é o aminoácido livre presente no mel em maior quantidade, sendo utilizado como critério de qualidade, evidenciando o nível de maturação dos méis e possíveis adulterações. O conteúdo de prolina varia em função da origem botânica do mel. Teores baixos de prolina indicam condições de processamento e armazenamento inadequados devido a este aminoácido reagir com açúcares redutores, como é o caso da glucose e da frutose, nas chamadas reações de Maillard. Embora o teor de prolina não esteja presente nos critérios de qualidade da União Europeia e na legislação portuguesa, é reconhecido que um mel genuíno deverá apresentar teores em prolina superiores a  $0,18 \text{ mg.g}^{-1}$  [31].

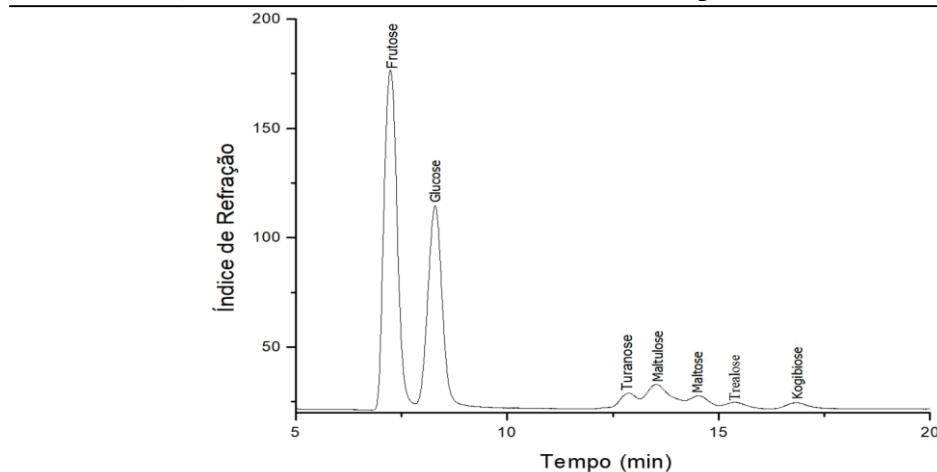
Neste estudo, (**Tabela IX**) observou-se que os valores obtidos para o conteúdo de prolina, oscilaram entre  $0,53 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $1,48 \text{ mg.g}^{-1}$ . Os valores apresentados indicam um alto teor em prolina indicativo de méis não adulterados ou com um ótimo grau de

maturação. Um estudo efetuado em dois méis de urze encontraram conteúdos de prolina superior a  $0,30 \text{ mg.g}^{-1}$  [112] e outro estudo apresenta valores de  $0,13 \text{ mg.g}^{-1}$  [113]. Estudos referem ainda que teores de prolina não é um indicador da origem botânica dos méis uma vez que estes variam dentro do mesmo tipo de mel [114]. No entanto, deve ser levado em consideração que há uma variação considerável de prolina, dependendo do tipo de mel [56], sendo a prolina adicionada por abelhas no processo de transformação de néctar em mel.

#### 4.2.8. Perfil de açúcares

O mel é uma solução supersaturada de açúcares cujos compostos maioritários são a frutose e a glucose. Os monossacáridos (frutose e glucose) representam cerca de 75 % dos açúcares encontrados no mel, seguidos dos dissacáridos (maltose, maltulose, turanose, melibiose, kojibiose, isomaltose e a trealose) e numa menor proporção, os trissacáridos (melizitose, rafinose e erlose). A percentagem de glucose e frutose para os méis de néctar não deverá ser menor que 60%, e para os méis de melada deverá ter um mínimo de 45%, [24]. Os méis de melada apresentam níveis mais elevados de trissacáridos (melezitose ou erlose), resultado da ação de diversas enzimas adicionadas pelos insetos sugadores. A presença de valores elevados de sacarose no mel pode ser indicativo de adulteração resultante da alimentação artificial das abelhas com xarope de sacarose, ou de uma colheita precoce do mel, em que a sacarose não tenha sido decomposta nos monossacáridos como adição de açúcares refinados, estando definido um valor máximo de 5% em mel de néctar [30]. Na **Figura 17**, apresenta-se um cromatograma, obtido por HPLC-RI.

O perfil de açúcares das diferentes amostras mostrou uma composição semelhante, com elevada presença dos monossacáridos frutose e glucose, e em menores quantidades a turanose, maltulose, maltose, trealose e kojibiose.



**Figura 17** - Cromatograma referente à análise do perfil de açúcares por HPLC-RI. da amostra A0.

O trissacárido erlose foi identificado nas amostras A1 (região de Chaves) e A3, enquanto o trissacárido melezitose foi identificado na amostra A3 (região de Aguiar da Beira) (**Tabela X**) em quantidades pouco significativas [115]. Estes resultados vêm também confirmar a condutividade elevada descrita anteriormente para estas amostras. Todas as amostras apresentam um teor de frutose superior ao de glucose, representando estes dois monossacáridos em conjunto mais de 60%, o que permite classificar, de acordo com a legislação internacional, todos os méis como méis de néctar. As amostras A8, A10 e A11, descritas neste trabalho como monoflorais de urze, apresentaram um valor médio de 39,8 g/100g de frutose e 31,1 g/100g de glucose, respectivamente (**Tabela X**). Em alguns estudos efetuados para méis de *Erica sp.* português encontraram-se níveis de frutose a variar entre 33,40 e 48,60 g/100 g e níveis de glucose a variar entre 26,67 e 38,42 g/100 g [115]. As amostras analisadas não possuem sacarose o que é indicativo de méis não adulterados.

A cristalização é um processo que ocorre de forma natural no mel dependendo da sua composição em açúcares e da humidade e que surge relacionado com o tipo de mel. As razões de F/G (frutose/glucose) e G/H (glucose/humidade) fornecem a informação do tempo que uma amostra de mel demora a cristalizar. A razão de frutose e glucose dependem em grande medida da fonte de néctar. Muitos investigadores relatam que a razão frutose e glucose apresenta um valor médio de 1,2 para o mel, afirmando que valores maiores que 1,33 implicam uma cristalização lenta, acima de 1,5 indica que o mel

não cristaliza e menor que 1,11 indica que a cristalização é rápida, este processo ocorre devidos a glucose ser um açúcar mais insolúvel em água. A velocidade com que a cristalização da glucose ocorre, também depende da razão G/H. De acordo com a literatura [100], a cristalização de um mel é lenta ou nula quando a relação G/H é inferior a 1,7 e rápida quando a razão é maior que 2,2 [100]. Na (**Tabela X**) pode-se verificar que as amostras analisadas á relação F/G apresenta valores entre 1,2 e 1,5 o que se pode afirmas que todas as amostras têm uma tendência lenta para cristalizar, e os valores de G/H oscilam entre 1,8 e 2,3 indicando-nos que as amostras apresentam uma propensão média para cristalizar, como exceção da amostra A4 (Aguiar da Beira) que apresenta um valor de 1,6 em que apresenta uma tendência nula para cristalizar.

**Tabela X** - Perfil de açúcares, obtido por HPLC-RI, das amostras de mel estudadas (valores expressos em g/100g de mel).

Amostras	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
<b>Frutose</b>	39,6 ± 0,0	39,6 ± 2,2	39,9 ± 0,2	41,8 ± 0,8	38,0 ± 0,3	43,0 ± 0,6	41,7 ± 0,5	38,0 ± 0,3	40,8 ± 2,4	39,8 ± 1,8	39,8 ± 0,1	38,8 ± 3,2
<b>Glucose</b>	31,2 ± 0,1	29,4 ± 0,1	28,4 ± 0,0	35,7 ± 0,9	25,7 ± 0,3	37,1 ± 0,7	33,2 ± 0,1	28,8 ± 0,6	30,7 ± 1,7	30,8 ± 1,2	32,4 ± 0,0	30,2 ± 2,0
<b>Sacarose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Turanose</b>	1,8 ± 0,1	3,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,6 ± 0,4	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2
<b>Maltulose</b>	2,1 ± 0,0	4,0 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,2 ± 0,0	2,2 ± 0,4	2,6 ± 0,2	3,3 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,2 ± 0,4	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2
<b>Maltose</b>	2,9 ± 0,0	5,4 ± 0,1	4,3 ± 0,5	2,1 ± 0,0	3,0 ± 0,7	3,0 ± 0,5	2,5 ± 1,2	4,2 ± 0,6	4,0 ± 0,6	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,5
<b>Treälose</b>	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<b>Melizitose</b>	-	-	-	1,5 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Rafinose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Melibiose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Isomaltose</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Kogibiose</b>	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1
<b>Erlose</b>	-	1,7 ± 0,2	-	1,2 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>F + G</b>	70,8	68,9	68,4	77,5	63,6	80,1	74,9	66,8	71,4	70,6	72,2	69,0
<b>F / G</b>	1,3	1,3	1,4	1,2	1,5	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,3
<b>G / H</b>	2,0	2,1	1,9	2,3	1,6	2,1	2,1	2,0	2,0	1,8	2,0	1,9

Nota: F+G- Relação frutose glucose; F/G - Razão de frutose e glucose; G/H – Razão de glucose humidade

### 4.3. Parâmetros nutricionais

O mel é um alimento natural, isento de quaisquer aditivos, considerado de elevado valor nutritivo. O seu conteúdo mineral está relacionado com a cor e o seu sabor, sendo frequentemente observado que os méis com maior conteúdo mineral são também os que apresentam uma cor mais escura e um sabor mais forte [87]. Para além disso, o conteúdo mineral contribui também para a condutividade elétrica do mel, verificando-se uma correlação positiva entre estes dois parâmetros.

Embora o *Codex Alimentarius* [30] não forneça valores para este parâmetro, a Norma Portuguesa 1307/ 83 (2<sup>a</sup> edição) [55] estabelece que o teor de cinza, deve apresentar um máximo de 0,6% para o mel de néctar e 1% para o mel de melada, e alguns estudos apresentam um valor médio de 0,17% (m/m) no mel, podendo variar entre 0,02% e 1,03% [58]. Os resultados obtidos neste estudo para o teor em cinzas, variam entre 0,22 e 0,54% (**Tabela XI**), encontrando-se dentro dos valores recomendados para o mel de néctar. Para além disso, as amostras de mel estudadas apresentaram valores semelhantes aos descritos para méis monoflorais de *Erica sp.* cujos valores se situam entre 0,20 e 0,43% [104] e para outros méis portugueses (valores entre 0,09 e 0,53%) [102]. Verificou-se ainda que as amostras com maiores teores em cinza foram as amostras A1, (0,54%) proveniente da região de Chaves, e A4 (0,47%) oriunda de Aguiar da Beira, descritas como monoflorais de castanheiro. Estas amostras foram também as que haviam apresentado os valores de condutividade elétrica mais elevados (**Tabela VII**), evidenciando uma correlação positiva entre estes parâmetros que é frequentemente reportada na literatura [103].

Normalmente, as proteínas que o mel possui são enzimas provenientes do néctar e pólen da planta e das secreções das glândulas salivares das abelhas. A quantidade de proteína total pode contribuir para definir o aroma que caracteriza cada tipo de mel devido as reações de Maillard que podem ocorrer. Alguns estudos apontam para uma semelhança de proteínas entre os vários méis, pois existem cerca de 20 proteínas não-enzimáticas [104].

Os valores de proteína total presente nas amostras analisadas oscilam entre os 0,19 e 0,59 g /100 g de mel (**Tabela XI**), encontrando-se de acordo com os valores registados em vários méis que apresentaram valores de proteína total a variar de 0,1 a 0,5%, embora

alguns méis como urze (*Calluna vulgaris*), podem apresentar um conteúdo em proteína mais elevado (1-2%) [61].

Tal como sucede para o conteúdo mineral e proteico, também não existe legislação que regule os limites para o valor energético e teor de hidratos de carbono presentes nos diferentes méis. As amostras de mel estudadas apresentaram valores semelhantes de hidratos de carbono, oscilando entre 81,83 e 84,85 g/100g, e de valor energético, com valores entre 329,1 e 341,4 kcal (Tabela XI). O valor energético encontrado nas amostras analisadas é muito semelhante ao descrito anteriormente em méis de *Erica sp.*, com um valor médio de 325,0 kcal e ao apresentado por méis de outras espécies e multiflorais, cujo valor médio foi de 321,4 kcal [87].

**Tabela XI** - Valores nutricionais do mel: Cinzas, energia, proteínas e hidratos de carbono.

Amostras	Cinzas (g/100g)	Energia (kcal)	Proteínas (g/100g)	Hidratos de Carbono (g/100g)
A0	0,42 ± 0,00	335,4	0,35 ± 0,05	83,50
A1	0,54 ± 0,01	341,4	0,59 ± 0,17	84,81
A2	0,33 ± 0,00	337,8	0,55 ± 0,21	84,25
A3	0,29 ± 0,00	335,6	0,19 ± 0,00	83,51
A4	0,47 ± 0,02	334,9	0,39 ± 0,00	83,41
A5	0,22 ± 0,01	329,1	0,32 ± 0,17	81,83
A6	0,27 ± 0,01	334,9	0,46 ± 0,03	83,52
A7	0,40 ± 0,02	335,1	0,20 ± 0,03	83,56
A8	0,23 ± 0,00	336,2	0,20 ± 0,08	83,84
A9	0,23 ± 0,00	335,9	0,29 ± 0,07	83,69
A10	0,22 ± 0,00	335,6	0,48 ± 0,04	83,43
A11	0,24 ± 0,00	337,7	0,55 ± 0,06	83,87

#### 4.4. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Atualmente tem-se vindo a assistir a um interesse crescente nas propriedades bioativas dos alimentos, particularmente no que se refere à atividade antioxidante, que é frequentemente associada com o teor de compostos fenólicos. Deste modo, procedeu-se à quantificação dos compostos fenólicos totais nas várias amostras de mel em estudo e

avaliou-se a respetiva atividade antioxidante, através da capacidade de captar radicais DPPH e do seu poder redutor.

Na **Tabela XII** são apresentados os resultados relativos à quantidade de compostos fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante das amostras de mel utilizadas neste estudo.

**Tabela XII** - Teor em compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das amostras de mel.

Amostras	Compostos fenólicos totais (mg EAG.g <sup>-1</sup> )	Poder redutor (mg EAG.g <sup>-1</sup> )	DPPH (mg.mL <sup>-1</sup> )
A0	1,34 ± 0,08	0,14 ± 0,01	11,53 ± 0,00
A1	1,49 ± 0,05	0,11 ± 0,01	13,75 ± 0,02
A2	1,52 ± 0,08	0,11 ± 0,01	13,40 ± 0,02
A3	1,07 ± 0,03	0,08 ± 0,01	19,47 ± 0,00
A4	1,08 ± 0,09	0,09 ± 0,01	20,65 ± 0,04
A5	1,55 ± 0,13	0,14 ± 0,01	10,10 ± 0,01
A6	1,95 ± 0,07	0,21 ± 0,01	5,07 ± 0,05
A7	1,93 ± 0,11	0,19 ± 0,04	3,02 ± 0,03
A8	1,73 ± 0,13	0,17 ± 0,03	9,23 ± 0,05
A9	1,63 ± 0,11	0,14 ± 0,01	6,56 ± 0,02
A10	1,69 ± 0,05	0,14 ± 0,00	10,48 ± 0,07
A11	1,70 ± 0,06	0,15 ± 0,01	8,39 ± 0,11

#### 4.4.1. Compostos fenólicos totais

Os valores obtidos para os compostos fenólicos totais nas amostras analisadas, que se encontram representados na **Tabela XII**, variaram entre 1,07 e 1,95 mg EAG.g<sup>-1</sup>, com um máximo de 1,95 e 1,93 mg EAG.g<sup>-1</sup> para as amostras A6 (região de Boticas) e A7 (região de Palmela), respetivamente, e um mínimo de 1,07 e 1,08 mg EAG.g<sup>-1</sup> para as amostras A3 e A4 provenientes de Aguiar da Beira. Verificou-se que as amostras com maior teor de compostos fenólicos correspondem a amostras de mel de cor âmbar escuro, enquanto que as amostras com menor teor de compostos fenólicos totais apresentaram uma coloração âmbar claro. Estes resultados evidenciam o contributo destes compostos para a coloração do mel, de acordo com o descrito anteriormente [116]. As amostras de mel classificadas como monofloral de urze (A8, A10 e A11) apresentaram teores de

---

compostos fenólicos totais compreendidos entre 1,69 e 1,73 mg EAG.g<sup>-1</sup>, que são comparáveis ao reportado em estudos anteriores onde se referem valores de 1,81±0,62 mg/g [87].

#### 4.4.2. Poder redutor

Na **Tabela XII**, estão representados os valores das amostras avaliadas pelo poder redutor, expressos em equivalentes de ácido gálico (mg EAG.g<sup>-1</sup>), observando-se uma variação entre 0,08 e 0,21 mg.EAG.g<sup>-1</sup>. Tal como descrito na literatura, é possível observar que as amostras que tinham apresentado um maior teor de compostos fenólicos totais, a A6 (região de Boticas) e a A7 (região de Palmela) são aquelas que evidenciaram um maior poder redutor: 0,21 e 0,19 mg EAG.g<sup>-1</sup>. Do mesmo modo, as amostras com menores teores de compostos fenólicos totais foram as que registaram menores valores de poder redutor: 0,08 e 0,09 mg.EAG.g<sup>-1</sup>, observados nas amostras A3 e A4 (região de Aguiar da Beira), respetivamente.

#### 4.4.3. Efeito bloqueador de radicais livres

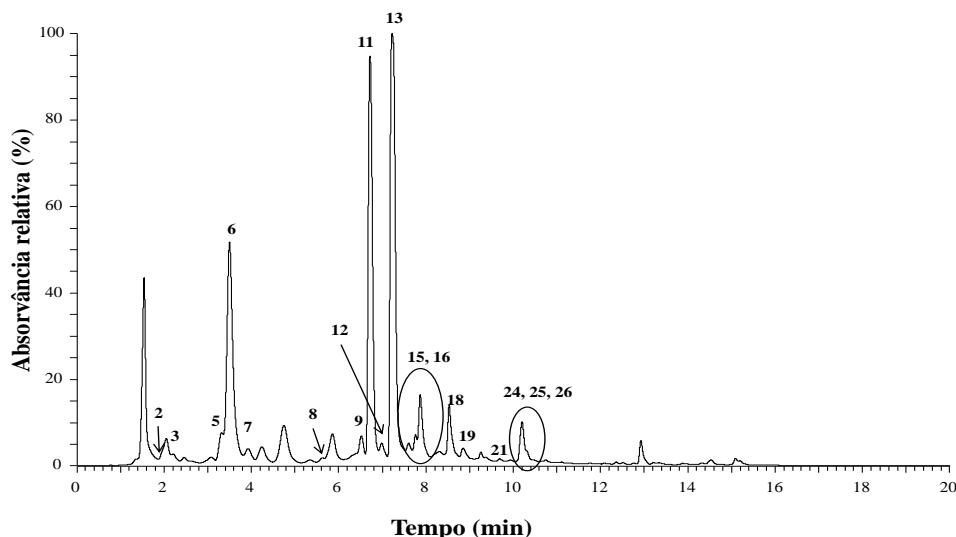
O DPPH (2,2-difenil-1- picrilhidrazilo) é um radical livre estável, para o qual as substâncias antioxidantes transferem eletrões ou átomos de hidrogénio. Deste modo, nas amostras de mel, quanto mais elevado apresentarem o valor de EC<sub>50</sub> menor será a capacidade da amostra neutralizar os radicais e menor será a sua atividade antioxidante.

Tal como referido para o poder redutor, as amostras A6 e A7 apresentaram a maior atividade antioxidante, com valores de 5,07 mg.mL<sup>-1</sup> para a amostra A6 e 3,02 mg.mL<sup>-1</sup> para a amostra A7, enquanto nas amostras A3 e A4 observam-se os valores mais baixos de atividade antioxidante, com valores de EC<sub>50</sub> de 19,47 mg.mL<sup>-1</sup> e 20,65 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente (**Tabela XII**). Estudos anteriores no mel de urze português revelaram valores médios para o EC<sub>50</sub> de 11,5 mg.mL<sup>-1</sup> [87], que podem ser considerados comparáveis aos observados para as amostras de mel de urze aqui estudadas onde se observou uma média de 9,37 mg.mL<sup>-1</sup> [87].

#### 4.5. Perfil de compostos fenólicos

Devido ao processo de colheita de néctar pelas abelhas, o mel resultante pode ter origem em diferentes espécies de plantas. Os méis monoflorais, como o de urze, devido às suas características organoléticas e propriedades biológicas específicas, têm grande procura comercial. Hoje em dia, novas tecnologias de análise, como a análise do perfil de compostos fenólicos, são usadas na caracterização e avaliação da autenticidade de méis associados a origens botânicas particulares [99].

O perfil de compostos fenólicos foi avaliado por UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>, após a extração destes compostos das amostras de mel em estudo. Na **Figura 18**, apresenta-se o perfil cromatográfico obtido para uma das amostras de mel estudadas. A identificação dos compostos foi efetuada através de UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>, o que permitiu a elucidação dos compostos fenólicos através da comparação do seu perfil cromatográfico, espectro UV e informação de espectrometria de massa, com compostos de referência. Quando os padrões não estavam disponíveis, a informação estrutural foi confirmada com a combinação dos dados UV e as fragmentações MS descritas na literatura.



**Figura 18** - Perfil fenólico, obtido por UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>, do extrato de mel referente nesta amostra A0, a 280 nm (os números na figura representam os compostos fenólicos identificados na amostra, **Tabela XIII**).

Na análise de ESI-MS<sup>n</sup> foi usado o modo negativo devido à grande sensibilidade que este modo apresenta na deteção das diferentes classes de compostos fenólicos [117].

### Capítulo III - Resultados e discussão

Na **Tabela XIII**, apresentam-se os vários compostos identificados em cada amostra, com o respetivo tempo de retenção, bandas de absorvância máxima e informação de espectrometria de massa.

**Tabela XIII** - Compostos fenólicos e ácido abscísico identificados por UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> nas amostras de mel em estudo.

Nº	Composto	t <sub>R</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)	[M-H] <sup>-</sup>	[M-H] <sup>-2</sup>
1	Ácido protocatéquico <sup>a</sup>	1,31	253	153	109
2	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoíco <sup>a</sup>	1,98	255	137	93
3	Ácido cafeico <sup>a</sup>	2,05	292, 322	179	135
4	Ácido elágico <sup>a</sup>	3,25	253, 367	301	301
5	Ácido cinâmico (derivado 1) <sup>b</sup>	3,32	278	165	147
6	Ácido <i>p</i> -cumárico <sup>a</sup>	3,50	310	163	119
7	Ácido cinâmico (derivado 2) <sup>b</sup>	3,62	278	262	244 (8), 218 (100), 200 (27), 147 (49)
8	Ramnósido de quercetina <sup>b,c1</sup>	5,63	256, 349	447	301
9	Ácido salicílico <sup>a</sup>	6,23	256	137	93
10	Ramnósido de campferol <sup>b,c1</sup>	6,52	265, 449	431	285
11	Ácido abscísico (isómero 1) <sup>b,c2</sup>	6,72	265	263	153 (10), 205 (25), 220 (100)
12	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoíco (derivado 1) <sup>b</sup>	6,98	221	199	181 (13), 155 (100), 137 (20)
13	Ácido abscísico (isómero 2) <sup>b,c2</sup>	7,22	265	263	153 (69), 154 (100), 220 (36)
14	Luteolina <sup>a</sup>	7,59	253, 268sh, 349	285	285 (100), 267 (54), 241 (63), 175 (52)
15	Quercetina <sup>a</sup>	7,76	256, 37	301	179 (100), 151 (69)
16	Éter de 5-metil-pinobanksina <sup>b,c1</sup>	7,87	287	285	267 (100), 252 (13), 239 (29)
17	Éter de 3-metil-quercetina <sup>b,c1</sup>	7,97	356, 255	315	300
18	Pinobanksina <sup>b,c1</sup>	8,53	292	271	253 (100), 225 (19), 151 (10)
19	Éter de metil-campferol <sup>b,c1</sup>	8,85	267, 35	299	284
20	Ramnetina <sup>b,c1</sup>	9,21	256, 367	315	300 (34), 193 (76), 165 (100)
21	Éter de dimetil-quercetina <sup>b,c1</sup>	9,50	256, 367	329	314
22	Cafeato de isoprenilo <sup>b,c1</sup>	9,74	298, 325	247	179 (100), 135 (100)
23	Cafeato de isoprenilo (isómero 1) <sup>b,c1</sup>	9,79	298, 325	247	179 (100), 135 (100)
24	Crisina <sup>a</sup>	10,17	268	253	253 (100), 225 (17), 209 (49), 151 (1)
25	Pinocembrina <sup>a</sup>	10,19	290	255	255 (16), 213 (100), 211 (40), 151 (26)
26	Galangina <sup>a</sup>	10,29	265, 300sh, 358	269	269 (100), 241 (61), 227 (20), 197 (22), 151 (20)
27	Cafeato de etilfenilo <sup>a</sup>	10,29	295, 325	283	179 (100), 135 (28)
28	Acetato de 3- <i>O</i> -pinobanksina <sup>b,c1</sup>	10,34	292	313	271 (18), 253 (100)
29	6-Metoxi-crisina <sup>b,c1</sup>	10,62	265, 300sh, 350sh	283	269

Nota: t<sub>R</sub> - tempo de retenção do compostos; [M-H]<sup>-</sup> - ião produto; [M-H]<sup>-2</sup> – fragmentação do ião produto.

<sup>a</sup>-Confirmado com padrão; <sup>b</sup>-Confirmado com fragmentação MS<sup>n</sup>; <sup>c1</sup> – Confirmado com referência [117];

<sup>c2</sup> – Confirmado com referência [118].

### Capítulo III - Resultados e discussão

---

Neste estudo foi possível, a identificação de vinte e sete compostos fenólicos, dos quais doze ácidos fenólicos e quinze flavonóides. Entre os ácidos fenólicos identificados, cinco são derivados do ácido benzóico (ácido protocatéquico, ácido elágico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido salicílico e ácido *p*-hidroxibenzóico (derivado 1)) e sete são derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico, ácido cinâmico (derivado 1), ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico (derivado 2), cafeato de isoprenilo, cafeato de isoprenilo (isómero 1) e cafeato de etilfenilo)). Dos quinze flavonóides identificados, sete pertencem à classe dos flavonóis (éter de metil-campferol, ramnetina, éter de dimetil-quercetina, quercetina, éter de 5-metil-quercetina, ramnósido de campferol e ramnósido de quercetina), quatro à classe das flavonas (6-metoxi-crisina, galangina, crisina e luteolina) uma flavanona (pinocembrina, e três di-hidroflavonóis (pinobanksina, acetato de 3-*O*-pinobanksina e o éter de 5-metil-pinobanksina). Para além dos compostos fenólicos, foram ainda identificados dois isómeros do ácido abscísico (isómero *cis,trans* e *trans,trans*), que são classificados como isoprenóides e que frequentemente são detetados como compostos fenólicos neste tipo de análises.

As amostras de mel analisadas apresentaram uma composição fenólica semelhante, em que os diferentes compostos estão presentes em quase todas as amostras, com algumas diferenças nas suas concentrações. De uma forma geral, oito compostos voláteis foram encontrados em diferentes concentrações em todas as amostras (ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico (derivado 2), ácido salicílico, ácido *p*-hidroxibenzóico, éter de 5-metil-pinobanksina, Pinobankina e a Crisina) (**Tabela XIV**). Entre os compostos identificados (**Tabela XIV**), pode-se verificar que o ácido *p*-cumárico e os dois isómeros do ácido abscísico (isómero *cis,trans* e *trans,trans*) são os que foram detetados na maior parte das amostras em maiores concentrações, seguindo-se o éter de 5-metil-pinobanksina.

Na **Tabela XIV**, verifica-se que as amostras que apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos é amostra A1 proveniente de Chaves com 412,1 mg/100 g e com menor quantidade é amostra A2 proveniente de Chaves com 73,2 mg/100 g.

**Capítulo III - Resultados e discussão**

**Tabela XIV** - Quantidade de compostos fenólicos, expressa em mg/100 g de mel, detetados nas amostras de mel.

<b>Compostos</b>	<b>(mg/ 100 g)</b>											
	<b>A0</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A6</b>	<b>A7</b>	<b>A8</b>	<b>A9</b>	<b>A10</b>	<b>A11</b>
Ácido protocatecuíco	-	-	-	-	-	-	-	11,08	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzólico	1,01	4,38	0,79	2,59	1,75	-	-	5,77	-	-	-	-
Ácido caféico	2,76	14,14	2,21	3,63	3,74	2,22	1,99	13,68	1,92	2,12	1,46	2,23
Ácido elágico	-	50,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido cinâmico (derivado 1)	3,09	-	-	15,90	-	3,64	2,36	4,76	2,40	2,40	1,18	1,85
Ácido <i>p</i> -cumárico	25,76	8,09	21,15	15,34	26,53	36,42	44,39	22,93	43,99	46,16	36,53	48,58
Ácido cinâmico (derivado 2)	3,80	11,44	1,55	6,24	3,15	4,53	3,04	8,85	3,45	3,49	2,81	3,56
Ramnósido de quercentina	2,49	-	1,90	0,52	3,23	2,39	4,16	5,88	3,04	3,19	2,02	2,20
Ácido salicílico	3,09	5,30	0,91	5,27	2,28	1,59	0,64	4,42	1,45	1,51	0,48	1,52
Ramnósido de campferol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,92	-
Ácido abscísico (isómero 1)	75,27	-	44,43	24,02	61,54	81,56	88,15	43,51	78,41	92,06	53,77	71,22
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzólico (derivado 1)	2,64	11,19	2,03	7,38	2,33	1,87	1,60	8,81	1,54	1,61	0,85	1,47
Ácido abscísico (isómero 2)	94,45	-	72,24	70,82	118,05	93,08	120,94	102,12	105,61	125,35	73,78	90,35
Luteolina	-	-	-	-	-	-	-	12,84	-	-	-	-
Quercetina	5,08	9,96	3,05	8,55	7,79	3,49	5,21	19,97	3,82	4,08	4,14	-
Éter de 5-metil-pinobanksina	13,12	26,78	3,75	14,15	20,80	18,73	20,24	51,86	17,26	17,32	12,59	17,71
Éter de 5-metil-quercetina	-	75,45	10,56	3,37	7,64	-	-	17,09	3,94	-	-	-
Pinobanksina	12,37	50,33	9,16	22,54	9,26	5,17	2,88	38,54	5,10	5,83	2,31	4,02
Éter de metil-campferol	6,12	-	5,49	9,41	24,60	5,56	7,13	-	4,03	4,93	16,96	5,71
Ramnetina	-	11,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Éter de dimetil-quercetina	-	7,25	-	0,49	-	-	-	4,27	-	-	-	-
Cafeato de isoprenilo	-	1,71	-	0,53	0,41	-	-	0,47	-	-	-	-
Cafeato de isoprenilo (isómero 1)	-	3,92	-	5,52	0,62	-	-	0,94	-	-	-	-
Crisina	9,17	45,66	1,82	6,38	12,77	3,65	2,80	20,50	1,25	1,84	2,23	2,60
Pinocembrina	3,61	48,12	6,58	16,50	2,51	1,36	-	32,35	2,15	2,99	1,01	1,63
Galangina	2,86	16,61	2,30	2,01	-	-	-	8,75	-	-	-	-
Cafeato de etilfenilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33
Acetato de 3- <i>O</i> -pinobanksina	-	6,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-Metoxi-crisina	-	4,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total (amostras)*</b>	96,98	412,1	73,2	146,3	129,4	90,6	96,5	293,8	95,3	97,5	91,5	93,4

Nota: \* Somatório dos compostos fenólicos.

Os ácidos fenólicos são um dos compostos mais frequentemente encontrados na composição dos produtos da colmeia e em especial no mel. Compostos como o ácido cafeico e seus derivados, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, ácido elágico, ácido protocatecuico e ácido salicílico estão descritos em méis com diferentes origens florais e em particular no mel de *Erica* sp. [120]. Em contrapartida, compostos como os ésteres de ácido cafeico, típicos da própolis, muito provavelmente terão a sua origem nesta resina produzida pelas abelhas [118, 120]. Pode-se verificar que em relação aos ácidos fenólicos a amostra A1 da região de Chaves, é a que apresenta maior quantidade em compostos derivados do ácido benzóico (70,91 mg/100g) e a amostra A11 proveniente de Boticas destaca-se pelos ácidos derivados do ácido cinâmico (56,55 mg/100g) (**Tabela XV**). O ácido elágico, só foi encontrado em maior quantidade na amostra A1 (região de Chaves) (**Tabela XIV**).

Os flavonóides que se encontram presentes no mel têm origem no pólen, na própolis e no néctar, sendo a própolis a fonte mais rica em flavonóides. A pinobanksina e seus derivados, a pinocembrina, a crisina e a galangina são compostos descritos como derivados da própolis, que estão presentes no mel por contaminação desta resina [118, 121]. A pinobanksina encontra-se presente na amostra A1, A3 e A7 e a pinocembrina na amostra A1e A3 com valores a variar entre 2,31-50,33 mg/100g e 1,01-48,12 mg/100g respetivamente (**Tabela XIV**). Outros flavonóides encontrados nestas amostras como a quercetina, campferol, luteolina e seus derivados encontram-se descritos na literatura como tendo origem no néctar, estando presentes no néctar de *Erica* sp. [120]. Alguns autores [122] referem que a quantidade de flavonóides é maior em méis colhidos durante estações secas com altas temperaturas e que os méis mais escuros contêm mais derivados de ácidos fenólicos, enquanto que méis mais claros contêm mais flavonóides [61]. A cor escura é também indicadora da presença de um elevado teor de minerais.

Nas amostras em estudo foram detetados dois isómeros do ácido abscísico (isómero 1 e 2) como compostos maioritários, com exceção da amostra A1 descrita como monofloral de castanheiro. Embora não sendo compostos fenólicos, estes compostos têm um comportamento cromatográfico semelhante, apresentando um  $UV_{max}$  de 265 nm. A identificação dos dois isómeros foi confirmada através do perfil de fragmentação do ião molecular  $m/z$  263, com a obtenção do fragmento maioritário a  $m/z$  220 correspondente à perda de  $CO_2$ , (**Tabela XIII**) [119]. A diferenciação entre os isómeros, ácido *cis*, *trans*-abscisico e ácido *trans*, *trans*-abscisico não foi possível, sendo necessário em trabalhos

### Capítulo III - Resultados e discussão

futuros comparar os resultados obtidos com os de padrões comerciais. O ácido abscísico (dois isómeros), que atua como uma hormona vegetal, com funções de inibição do crescimento, promoção da dormência e germinação das sementes e ajudar a planta a tolerar condições de stress hídrico e ambiental. As espécies florais dos méis analisados apresentam um período de floração na estação seca, o que justifica a presença do ácido abscísico nas amostras monoflorais e multiflorais. Esta hormona vegetal foi anteriormente reconhecida como marcador floral do mel de urze [119] e está presente no néctar e no mel de variadas fontes florais [67, 121]. O seu conteúdo variou entre 24,02 e 92,06 mg/100g para o isómero 1 e 70,82 e 125,3 mg/100g para o isómero 2 (**Tabela XIV**). Bertoncelj et al.(2011) [119], identificou os dois isómeros, tendo verificado uma maior percentagem de ácido *cis*, *trans*-abscísico nas amostras analisadas. Na comparação por classes, estes dois compostos foram os maioritários, apresentando um total de 1780,73 mg/100g (**Tabela XV**).

Na seguinte **Tabela XV**, estão agregados os resultados dos compostos individuais.

**Tabela XV** - Conteúdo das principais classes de compostos fenólicos presentes em amostras de mel.

Amostras	Ácidos fenólicos (mg/100g)		Flavonóides (mg/100g)			Isoprenóides (mg/100g)		Total*
	Derivados do ácido benzóico	Derivados do ácido cinâmico	Flavanonas	Flavonas	Flavonóis	Di- hidroflavanona	Ácido abscísico (isómero 1, 2)	
<b>A0</b>	6,74	35,42	3,61	12,03	13,69	25,49	169,71	96,98
<b>A1</b>	70,91	39,31	48,12	66,83	103,75	83,18	0,00	412,10
<b>A2</b>	3,73	24,92	6,58	4,12	21,00	12,90	116,68	73,24
<b>A3</b>	15,23	47,16	16,50	8,39	22,34	36,69	94,84	146,32
<b>A4</b>	6,36	34,45	2,51	12,77	43,26	30,06	179,59	129,42
<b>A5</b>	3,46	46,80	1,36	3,65	11,43	23,90	174,65	90,59
<b>A6</b>	2,24	51,79	0,00	2,80	16,50	23,12	209,09	96,45
<b>A7</b>	30,08	51,63	32,35	42,08	47,21	90,40	145,63	293,76
<b>A8</b>	2,99	51,75	2,15	1,25	14,82	22,35	184,02	95,32
<b>A9</b>	3,12	54,17	2,99	1,84	12,21	23,14	217,41	97,48
<b>A10</b>	1,33	41,98	1,01	2,23	30,04	14,91	127,55	91,51
<b>A11</b>	3,00	56,52	1,63	2,60	7,92	21,73	161,56	93,42

\*Nota: Somatório dos compostos fenólicos de cada amostra.

As amostras classificadas como mel de urze (A8, A10 e A11), sendo estas de cor âmbar escuro apresentam maior concentração em ácidos fenólicos (157,61 mg/100g) e

menor quantidade de flavonóides (122,64 mg/100g). Relativamente ao teor dos dois isómeros de ácido abscísico apresentaram um valor de 473,13 mg/100g. Assim sendo, pode-se considerar esta hormona vegetal como um dos constituintes fitoquímicos mais importantes para a autenticação deste tipo de mel.

#### 4.6. Compostos voláteis

O aroma é uma característica organolética com um impacto decisivo na apreciação do mel pelos consumidores, podendo definir o seu valor comercial. Todos os compostos voláteis presentes no mel, incluindo aqueles que se encontram presentes em baixa concentração, têm impacto no seu aroma [123]. Recentemente, tem aumentado o interesse do mundo académico na deteção de compostos voláteis que possam, de forma isolada ou em conjunto com outros parâmetros, funcionar como marcadores de origem botânica. No entanto, por uma variedade de razões, esta tarefa é bastante complexa, porque além da origem floral, o perfil de compostos voláteis do mel pode variar com as técnicas de manejo apícola, condições climáticas e pelo processamento e condições de armazenamento [99].

Na **Tabela XVI**, apresenta-se o perfil em compostos voláteis das amostras de mel estudadas, tendo-se identificado cinquenta e nove compostos voláteis por GC-MS, com os respetivos tempos de retenção ( $t_R$ ) e índices de retenção linear (LRI). Foi possível observar uma boa correspondência entre os valores para os índices de retenção lineares teóricos obtidos da biblioteca NIST e os valores calculados, o que permite um maior suporte para as identificações propostas.

**Tabela XVI** - Compostos voláteis presentes nas amostras analisadas.

Composto	$t_R$	LRI	LRI teórico <sup>a</sup>
Benzaldeído	7,928	962	958
Octanal	9,678	1009	1001
Fenilacetaldeído	11,183	1045	1046
Acetofenona	12,251	1070	1059
Óxido de <i>cis</i> -linalol	12,443	1074	1068
1-Octanol	12,618	1078	1074
4,5- Dipropenil-dihidro-furan-2-ona	13,038	1088	-
Óxido de <i>trans</i> -linalol	13,143	1091	1086
2-Nonanona	13,371	1096	1093

**Capítulo III - Resultados e discussão**

<b>Compostos</b>	<b>t<sub>R</sub></b>	<b>LRI</b>	<b>LRI teórico<sup>a</sup></b>
Nonanal	13,948	1109	1107
Hotrienol	14,176	1114	-
2-Feniletanol	14,351	1118	1120
Isoforona	14,666	1125	1124
E,E-2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	14,998	1132	1132
Aldeído de lilás B	15,541	1144	1145
4-oxoisoforona	15,699	1147	1145
Aldeído de lilás A	15,874	1151	1154
Óxido de nerol	16,014	1154	-
Aldeído de lilás D	16,521	1165	-
Benzoato de etilo	16,784	1171	1171
<i>trans</i> -3-caren-4-ol	16,941	1175	-
Nonanol	17,169	1180	1176
Salicilato de metilo	17,729	1192	1191
A-Terpinol	17,974	1197	1195
Hotrienol (isómero)	18,026	1198	-
Safranal	18,061	1199	1197
Ocimenol	18,079	1200	-
Octanoato de etilo	18,236	1203	1201
Decanal	18,586	1211	1208
3-Fenilfurano	19,076	1222	1224
Acetato de etilfenilo	20,092	1244	1245
<i>p</i> -Anisaldeído	20,652	1257	1258
Indano-4-carboxaldeído	21,281	1271	-
Cinamaldeído	21,439	1274	-
2,4,5-Trimetil-phenol	21,527	1276	-
δ-Octalactona	21,842	1282	-
Timol	22,542	1298	1295
β-Metil-γ-octalactona	23,574	1322	-
Mesitol	23,591	1322	-
4-Metil-1-naftaleno	24,222	1337	-
Eugenol	24,992	1354	1355
β-Damascenona	25,990	1377	1380
(E)-α-Damascona	26,042	1378	-
Ácido decanóico	26,567	1390	1394
<i>cis</i> -Jasmona	26,690	1393	1394
Decanoato de etilo	26,970	1400	1403
2,5,8-Trimetil-1,4-dihidronaftaleno	27,057	1402	-
γ-Decalactona	29,858	1469	-
δ-Decenolactona	30,121	1475	-
2',6'-Dimetil-4'-propoxi-acetofenona	30,260	1478	-
2-Fenil-5-metil-2-hexenal	30,470	1483	-

### Capítulo III - Resultados e discussão

Composto	$t_R$	LRI	LRI teórico <sup>a</sup>
$\delta$ -Decalactona	30,785	1491	1490
Pentadecano	31,223	1501	-
Hexadecano	31,310	1503	-
3,7,7-Trimethyl-1-penta-1,3-dienil-2-oxabiciclo[3.2.0]hept-3-eno	32,623	1537	-
1,3,5-Tri-isopropilbenzeno	34,828	1592	-
4'- <i>tert</i> -Butil-2',6'-dimetilacetofenona	34,863	1593	-
Heptadecano	39,046	1704	-
Heneicosano	45,224	1902	-

<sup>a</sup>(<http://webbook.nist.gov/chemistry/>, acedido no dia 20 de Setembro de 2017)

De uma forma geral, os compostos maioritários que foram identificados nas amostras de mel foram os terpenos hotrienol, timol e o óxido de *cis*-linalol, para além do aldeído nonanal (**Tabela XVII**). O hotrienol é um composto que é detetado com bastante frequência em amostras de mel [37]. No entanto, para as amostras A1 (região de Chaves) e A7 (região de Palmela) os compostos maioritários são o 1-nanonol e o nonanal compostos associados às abelhas e também detetados em quantidades significativas em amostras de mel de eucalipto [80, 124]

Nas amostras A6 e A2, para além do hotrienol, temos também o óxido de *cis*-linalol, enquanto que para a A8, A9, A10 e A11 surge também o timol, e na amostra A0, A4 e A5 surge o 3-fenilfurano. O timol é um terpeno que surge em alguns méis como marcador floral, como é no caso de méis de *Tilia* spp. e *Robinia*, a sua presença nas amostras analisadas possa ter resultado do uso deste composto como acaricida no tratamento contra a varroose por parte dos apicultores, podendo a sua presença ser uma contaminação ou ter origem botânica. O 3-fenilfurano é também um composto que surge descrito como estando presente no mel, e produto resultante das reações de Maillard [125]. Estes compostos podem ser formados durante a obtenção do mel em operações que envolvam tratamentos térmicos, mesmo a temperaturas de 50°C, ou durante o armazenamento do mesmo. Durante a extração dos compostos por SPME, o mel foi colocado num banho termostatizado à temperatura de 50°C, o que poderia contribuir para a formação deste tipo de compostos. No entanto, os resultados mostram que estes compostos não foram detetados em todas as amostras de mel analisadas e que se encontram presentes em quantidades bastante distintas. Para além disso, é possível encontrar na bibliografia estudos onde se utilizam temperaturas de 50°C, ou até superiores, para a análise de compostos voláteis do mel por SPME, sem que isso tenha tido algum efeito

**Tabela XVII** - Resultados dos compostos voláteis encontrados nestas amostras, em % relativa.

Compostos	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
Benzaldeído	1,36	-	4,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Octanal	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenilacetaldeído	5,76	-	2,01	6,80	4,66	1,01	0,95	-	0,67	0,70	1,59	0,67
Acetofenona	0,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Óxido de <i>cis</i> -linalol	0,42	2,28	9,49	7,17	5,23	9,19	17,20	2,50	8,40	10,11	5,97	6,20
1-Octanol	-	-	-	5,42	1,82	-	-	-	-	-	-	-
4,5- Dipropenil-dihidro-furan-2-ona	-	-	-	-	-	-	0,96	-	0,46	0,56	-	-
Óxido de <i>trans</i> -linalol	-	-	1,79	-	-	1,94	5,36	-	1,35	1,96	1,75	1,73
2-Nonanona	0,59	-	-	-	-	-	0,87	-	-	-	-	-
Nonanal	-	12,20	-	-	-	-	-	22,40	-	-	-	-
Hotrienol	58,08	-	59,40	48,11	46,34	56,01	26,19	-	53,63	54,59	54,88	38,26
2-Feniletanol	1,78	-	1,32	2,67	3,87	1,04	0,66	7,43	0,62	0,26	1,18	0,84
Isoforona	0,40	-	0,47	-	0,78	-	0,29	-	0,47	0,46	0,44	1,16
E,E-2,6-Dimetil-1,3,5,7-Octatetraeno	0,37	-	0,64	-	-	-	-	-	0,67	0,44	0,77	-
Aldeído de lilás B	1,85	-	-	-	-	0,63	0,23	-	0,36	0,39	-	0,74
4-Oxoisoforona	1,92	-	1,21	2,36	2,66	1,17	1,05	-	0,57	1,27	0,96	-
Aldeído de lilás A	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27	0,24	0,63	0,79
Óxido de nerol	0,99	-	1,25	-	-	1,19	4,17	-	1,19	0,91	1,03	1,22
Aldeído de lilás D	0,69	-	-	-	-	0,39	0,25	-	-	-	0,25	-
Benzoato de etilo	1,73	-	-	-	-	0,90	0,25	7,45	-	-	0,80	-
<i>trans</i> -3-caren-4-ol	-	9,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonanol	0,95	44,92	2,59	12,52	3,58	-	1,23	12,78	-	-	-	-
Salicilato de metilo	-	-	-	-	-	0,23	-	-	0,24	0,19	-	-
$\alpha$ -Terpinol	-	-	1,70	3,12	-	-	-	2,95	-	-	-	-
Hotrienol (isómero)	-	-	-	-	-	2,86	-	-	-	0,76	-	-
Safranal	-	-	-	-	0,97	-	1,98	-	-	-	-	-
Ocimenol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,68	-	-	-
Octanoato de etilo	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-
Decanal	1,03	-	-	1,32	0,93	0,54	-	2,73	0,25	0,20	1,80	0,46
3-Fenilfurano	7,08	-	1,36	1,41	7,40	1,33	1,36	-	1,20	1,26	4,51	0,61
Acetato de etilfenilo	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	-
P-Anisaldeído	0,32	-	-	-	3,67	-	-	-	-	-	2,89	0,39
Indano-4-carboxaldeído	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cinamaldeído	-	3,50	1,85	-	1,05	0,31	-	-	-	-	-	-
2,4,5-Trimetil-phenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,28	-	-
$\delta$ -Octalactona	-	-	-	-	-	0,54	-	-	-	-	-	-
Timol	-	2,23	0,53	1,92	5,25	0,36	2,58	8,86	18,30	16,24	6,82	28,73

### Capítulo III - Resultados e discussão

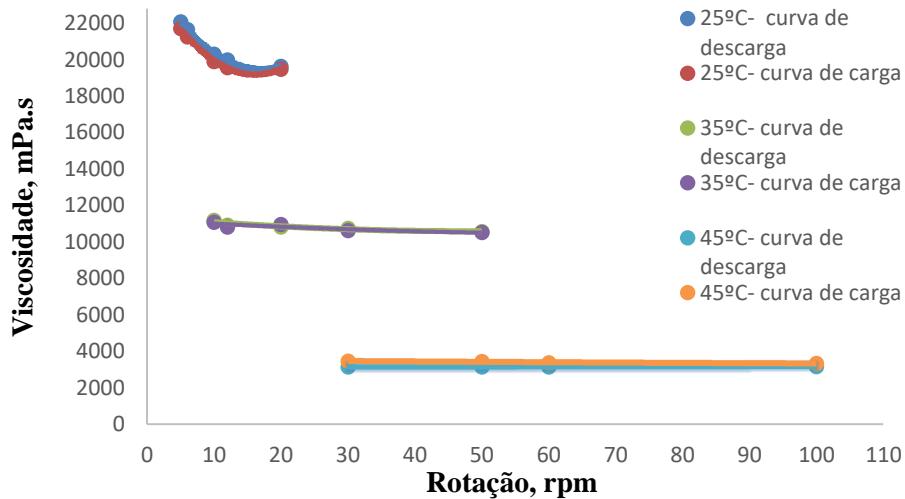
Compostos	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
β-Metil-γ-octalactona	-	5,10	-	-	-	-	0,62	-	-	-	-	-
Mesitol	0,78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Metil-1-naftaleno	0,70	-	-	-	-	0,25	0,65	-	0,20	0,27	-	-
Eugenol	-	-	-	-	-	-	-	3,41	-	-	-	-
β-Damascenona	0,58	-	-	1,03	0,76	-	-	-	-	-	0,45	-
(E)-α-Damascona	-	-	-	-	-	-	0,56	6,01	0,40	1,16	-	-
Ácido decanóico	-	-	-	2,26	-	0,99	2,32	-	0,49	-	1,00	2,48
Cis-Jasmona	-	-	-	-	-	-	-	1,80	-	-	-	-
Decanoato de etilo	2,28	-	-	-	-	0,63	-	1,30	-	-	-	-
2,5,8-Trimetil-1,4-dihidronaftaleno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,67	-
γ-Decalactona	2,90	-	2,72	-	1,14	4,39	6,36	-	3,32	2,35	1,83	5,01
δ-Decenolactona	0,66	-	-	0,45	-	4,40	-	-	-	-	-	-
2',6'-Dimetil-4'-propoxi-acetofenona	-	-	-	-	-	-	1,47	-	-	-	-	60
2-Fenil-5-metil-2-hexenal	-	-	-	-	-	-	0,33	-	-	-	-	-
δ-Decalactona	4,02	-	2,30	-	1,65	-	4,78	-	2,90	2,83	1,62	4,23
Pentadecano	-	-	0,62	0,59	0,64	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecano	-	1,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,7,7-Trimethyl-1-penta-1,3-dienil-2-oxabiciclo[3.2.0]hept-3-eno	-	-	-	1,23	6,17	-	-	-	1,64	1,52	6,22	3,39
1,3,5-Tri-isopropilbenzeno	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4'-tert-Butil-2',6'-dimetilacetofenona	-	-	-	-	-	1,99	14,11	-	0,99	0,69	-	1,00
Heptadecano	-	7,53	1,83	1,62	1,27	0,83	1,08	6,36	0,21	0,21	0,54	0,58
Heneicosano	-	9,86	2,10	3,12	-	2,31	2,16	7,30	0,38	0,24	1,14	1,56

## 4.7. Propriedades reológicas

### 4.7.1. Viscosidade

O comportamento de escoamento das amostras de mel foi avaliado fazendo o registo da viscosidade quando se aumenta a velocidade de rotação do elemento móvel (curva de carga) e posteriormente, quando se reduz essa velocidade (curva de descarga). Este procedimento foi realizado para todas as amostras de mel em estudo, a diferentes temperaturas (25°C, 35°C e 45°C), estando os resultados obtidos para a amostra A7 representados na **Figura 19**. Este estudo também possibilitou a classificação das diferentes amostras de mel como sendo fluídos Newtonianos ou não Newtonianos, dependendo do comportamento da viscosidade em função da velocidade de rotação do

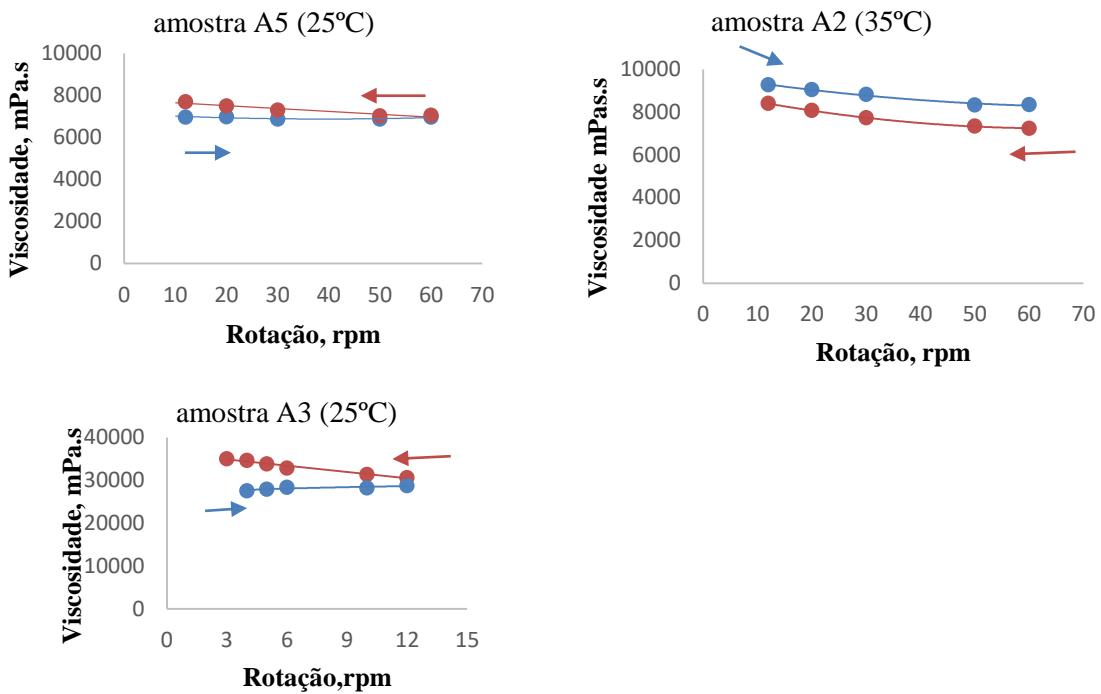
elemento móvel do viscosímetro. Através da observação da **Figura 19**, é possível verificar que a viscosidade da amostra diminui com o aumento da temperatura, de acordo com o que é frequentemente reportado na literatura [126].



**Figura 19** - Viscosidade em função da velocidade de rotação do *spindle* do viscosímetro para a amostra de mel A7, ensaiada às temperaturas de (25°C, 35°C e 45°C).

Foi também possível observar que, para as temperaturas de 35°C e 45°C, a viscosidade da amostra de mel A7 se manteve constante, independentemente da velocidade de rotação do *spindle* do viscosímetro. Este comportamento é típico de fluidos Newtonianos e observou-se para a grande maioria das amostras de mel ensaiadas. À temperatura de 25°C, a viscosidade não se apresenta constante, registou-se uma diminuição progressiva da viscosidade aparente da amostra de mel A7 com o aumento da velocidade de rotação, o que corresponde a um comportamento de fluido não Newtoniano, designado de pseudoplástico [127]. Este comportamento também se verificou em outras amostras para esta mesma temperatura (A0, A8), bem como para as amostras A0, A3 e A5 à temperatura de 35°C.

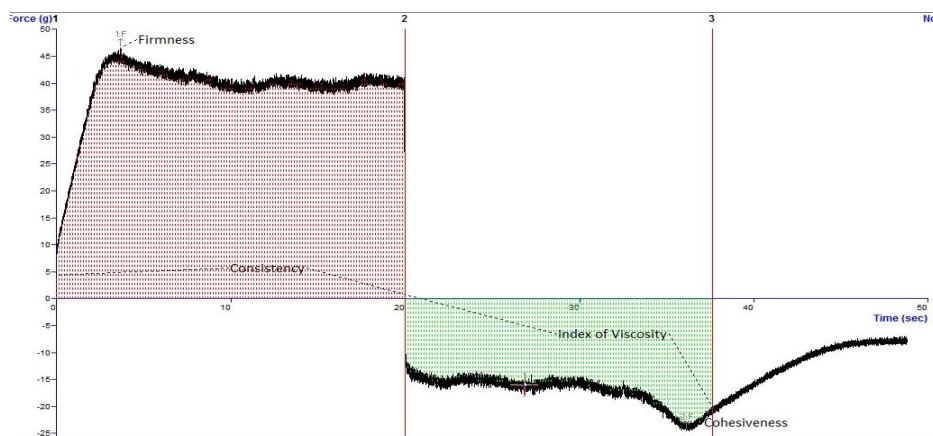
Foi ainda avaliada a dependência da viscosidade relativamente ao tempo (**Figura 20**), tendo-se verificado que para algumas das amostras (A2 a 35°C, A3 a 25°C e A5 25°C), que apresentaram um comportamento dependente da velocidade de rotação do *spindle*, as curvas de carga (setas a azul) e de descarga (setas a vermelho) não se sobreponem, ou seja existe um comportamento não Newtoniano, dependente da velocidade de rotação e do tempo, que é designado de tixotrópico.



**Figura 20** - Variação da viscosidade em função do tempo, para as amostras de mel A3 e A5, ensaiadas à temperatura de 25°C e 35°C.

#### 4.7.2. Textura

A textura das várias amostras de mel foi avaliada com recurso a um texturómetro, através da realização de testes de extrusão de retorno (*back extrusion*), com registo dos parâmetros firmeza, consistência, índice de viscosidade e coesividade. Na **Figura 21**, ilustra-se o traçado fornecido pelo *software* do texturómetro para a amostra A3, sendo possível identificar os parâmetros registados pelo equipamento.



**Figura 21** - Traçado fornecido pelo reómetro durante um ensaio de extrusão de retorno (*back extrusion*).

A firmeza e a consistência são avaliadas durante o movimento de penetração do disco na amostra para análise, enquanto que a coesividade e o índice de viscosidade são registados durante o movimento de retorno da sonda.

Os registos efetuados (**Figura 21**), correspondem aos parâmetros utilizados para definir a firmeza (valor máximo no eixo positivo vertical), a coesão (valor máximo no eixo negativo vertical), consistência (área da curva positiva) e viscosidade (área de curva negativa).

Na **Tabela XVIII**, podemos encontrar os dados referentes à análise da textura das amostras de mel utilizadas durante este estudo.

**Tabela XVIII** - Caracterização da textura das amostras de mel: firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade.

Amostras	Firmeza (g)	Consistência (unidades arbitrárias )	Coesividade (g)	Índice de viscosidade (unidades arbitrárias)
A0	64,38 ± 0,80	1031,15 ± 23,75	36,46 ± 0,38	526,58 ± 17,67
A1	189,97 ± 3,16	3376,89 ± 41,88	161,33 ± 9,31	1819,16 ± 591,19
A2	89,62 ± 7,34	1529,62 ± 33,67	61,63 ± 2,80	985,94 ± 28,99
A3	75,12 ± 1,48	1318,42 ± 33,98	51,71 ± 0,81	800,92 ± 32,00
A4	68,57 ± 5,82	1139,48 ± 21,97	41,03 ± 2,85	633,19 ± 20,47
A5	41,31 ± 0,11	683,28 ± 1,40	22,46 ± 0,33	215,62 ± 3,96
A6	99,33 ± 2,87	1774,73 ± 43,64	75,00 ± 2,85	1197,68 ± 32,44
A7	79,75 ± 1,01	1416,78 ± 12,80	55,00 ± 0,98	890,69 ± 22,37
A8	72,64 ± 0,90	1240,90 ± 7,78	46,00 ± 0,42	740,24 ± 2,19
A9	75,15 ± 0,16	1309,09 ± 3,09	50,48 ± 0,15	801,56 ± 5,09
A10	62,16 ± 0,41	1079,69 ± 6,81	38,82 ± 0,87	596,43 ± 8,88
A11	71,89 ± 1,11	1260,43 ± 17,06	46,28 ± 1,21	745,39 ± 21,82

As amostras de mel estudadas apresentaram valores de firmeza compreendidos entre os 41,31 e 189,97 g, valores de consistência que variam entre 139,48 e 3376,89 (unidades arbitrárias), coesividade entre os 22,46 e 161,33 g e valores de índice de viscosidade situados entre 215,62 e 1819,16 (unidades arbitrárias). A informação disponível na

literatura relativa à caracterização reológica de méis utilizando ensaios de extrusão de retorno é escassa, para além das condições experimentais influenciarem os resultados obtidos. Num estudo desse tipo, foram avaliados méis de Espanha que apresentaram valores de firmeza a variar entre 24 e 213 g, valores de consistência entre 407 e 2938 (unidades arbitrárias), valores de coesividade compreendidos entre 8 e 98 g e valores para o índice de viscosidade entre 68 e 1786 (unidades arbitrárias ) [128].

Foi possível verificar que a amostra A1 (Chaves) apresentou os maiores valores para os vários parâmetros analisados, enquanto que a amostra A5 (região de Vila Real) foi a que registou os menores valores. Estes resultados vão ao encontro do observado quando se avaliou a viscosidade das amostras de mel através da utilização do viscosímetro rotacional, tendo-se também aí verificado que a amostra A1 apresentava o maior valor de viscosidade, enquanto que a amostra A5 apresentou o menor valor.



# Capítulo IV



## Conclusão Perspetivas de trabalho



## Conclusão

Os resultados da análise melissopalinológica mostram que as amostras de mel analisadas contêm uma grande diversidade de grãos de pólen, não se tendo identificado elementos de melada, o que permite concluir que se tratam de méis de néctar. Identificaram-se 43 tipos de pólen, sendo o pólen de urze (*Erica* sp), *Castanea sativa* e *Rubus* os maioritários. O pólen de urze (*Erica* sp) está presente em 10 amostras com percentagens entre 1,2 % e 46,6%, sendo as amostras A8 (região da Lousã), A11 e A10 (região de Boticas) classificadas como mel monofloral de urze. Para além destas, existem quatro amostras (A0, A2, A5 e A9) que apresentam percentagens de pólen muito próximas do limite estabelecido por alguns estudos que consideram méis de urze (superior a 36,7 %). Verificou-se ainda que duas amostras (A1 e A4) apresentam quantidades significativas de pólen de *Castanea sativa*, sendo mesmo classificadas como mel monofloral de castanheiro. As restantes amostras são classificadas como multiflorais. Assim, embora todas as amostras analisadas tenham no seu rótulo a designação de mel de urze, os resultados da análise melissopalinológica parecem indicar que apenas as amostras de mel A8, A10 e A11 correspondem realmente a essa classificação. Deste modo, e embora não esteja em causa a segurança alimentar, torna-se evidente a necessidade de encontrar mecanismos adicionais para garantir a autenticidade deste tipo de produto alimentar. As amostras de mel analisadas apresentam valores para os diversos parâmetros nutricionais dentro do que é habitualmente referenciado em estudos sobre o mel, apresentando uma cor âmbar escuro, com a exceção das amostras de mel A3 e A4 (região de Aguiar da Beira), que apresentam uma cor âmbar claro. O teor em humidade das amostras de mel encontra-se dentro dos limites estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 214/2003, de 18 de setembro, ou seja, inferior a 20%, o que permite concluir que o mel terá sido extraído com o adequado grau de maturação, o que reduz a probabilidade da ocorrência de possíveis processos de fermentação do mel, estas amostras de mel comercial de urze apresentam valores de pH compreendidos entre 3,8 e 4,5. Os valores de acidez livre situam-se entre 22,3 e 45,0 meq.kg<sup>-1</sup>, encontrando-se abaixo dos 50,0 meq.kg<sup>-1</sup> estipulados na legislação portuguesa, e indicando a ausência de processos de fermentação indesejáveis para a qualidade do mel.

#### Capítulo IV – Conclusão e perspetivas de trabalho

---

Relativamente à condutividade elétrica, as amostras de mel analisadas apresentaram valores entre 0,52 e 1,08 mS.cm<sup>-1</sup>. De uma forma geral, as amostras apresentaram valores de condutividade inferiores a 0,80 mS.cm<sup>-1</sup>. Apenas as amostras A0, A1, A4 e A7 apresentaram valores de condutividade superiores a 0,80 mS.cm<sup>-1</sup>. De acordo com a legislação, méis de flores de castanheiro ou mistura de méis apresentam valores de condutividade superiores a 0,80 mS.cm<sup>-1</sup>. Os resultados da análise melissopalinológica mostraram que as amostras de mel A1 e A4 parecem corresponder a mel monofloral de castanheiro, o que surge reforçado pelos elevados valores de condutividade apresentados por estas amostras.

A análise do perfil em açúcares das amostras de mel evidenciou a presença maioritária de frutose e de glucose, que no seu total perfazem mais de 60,0% dos açúcares detetados, à semelhança do que é normalmente observado em amostras de mel. Embora em menor proporção, foram ainda detetados outros açúcares, tais como turanose, maltulose, maltose, trealose, kojibiose e erlose, não se tendo detetado a presença de sacarose. Os trissacáridos erlose e melizitose que são frequentemente associados à presença de vestígios de melada foram detetados nas amostras A1 (região de Chaves) e A3 (região de Aguiar da Beira). Deste modo, e apesar de existirem referências à formação destes trissacáridos devido às condições de humidade e temperatura no interior da colmeia, não foram detetados através da análise melissopalinológica. A análise do perfil de açúcares também possibilita a avaliação da maior ou menor tendência que os méis têm para a cristalização, frequentemente associada pelos consumidores a um mel de menor qualidade. Neste estudo, os valores encontrados para a relação entre o teor em glucose e a quantidade de água, (G/H) variam entre 1,6 e 2,1 g/100g, indicando que na generalidade as amostras de mel apresentam uma lenta/média tendência para cristalizar, e a amostra A4 (Aguiar da Beira), que apresenta um valor para G/H de 1,6 tem uma tendência nula para a cristalização.

A avaliação do teor de 5-HMF e do índice diastásico fornece informação importante sobre a qualidade do mel, nomeadamente no que se refere à ocorrência de tratamentos térmicos ou de condições de armazenamento inadequadas. De uma forma geral, a quantidade de 5-HMF detetado e o valor para o índice diastásico estão de acordo com o estipulado pelo Decreto-Lei nº214/2003, de 18 de setembro, sugerindo que as amostras

de mel foram processadas e armazenadas de uma forma adequada. No entanto, a amostra A6 (região de Boticas) apresentou um teor de 5-HMF de  $66,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , que excede o limite máximo admissível de  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Esta amostra apresentou um índice diastásico de 11,5 DN, que embora seja superior aos 8,0 DN que se encontram legislados, foi o valor mais baixo registado para as amostras analisadas. Deste modo, não será de excluir a possibilidade de ter existido um processamento ou armazenamento menos adequado deste mel. A determinação do teor de prolina é tida como um indicador do estado de maturação do mel e da ocorrência de possíveis adulterações. Embora não exista um valor estipulado na legislação portuguesa, a IHC refere como limite mínimo um valor de  $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . As amostras de mel analisadas apresentaram teores de prolina compreendidos entre 820 e 1480  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , indicando um adequado estado de maturação e a ausência de eventuais adulterações.

A determinação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteau mostrou que as amostras de mel analisadas contêm entre 1,08 e 1,95 mg EAG.g<sup>-1</sup>. As amostras A6 e A7 apresentaram os teores de compostos fenólicos totais mais elevados (1,95 e 1,93 mg EAG.g<sup>-1</sup>, respetivamente), seguidas das amostras A8, A10 e A11 (1,73, 1,69 e 1,70 mg EAG.g<sup>-1</sup>, respetivamente) que, de acordo com os resultados da análise melissopalinológica, foram classificadas como méis monoflorais de urze. Todas estas amostras apresentaram uma atividade antioxidante, expressa em termos do seu poder redutor e da sua capacidade para captar radicais DPPH, superior à exibida pelas restantes amostras analisadas, evidenciando que os méis monoflorais de urze possuem uma interessante atividade antioxidante que poderá contribuir de alguma forma para as propriedades terapêuticas frequentemente associadas a este tipo de mel.

As determinações do perfil de compostos fenólicos e de compostos voláteis têm vindo a ser utilizadas para uma mais aprofundada caracterização de amostras de mel e também na tentativa de encontrar marcadores da origem botânica para os mesmos. A análise do perfil de compostos fenólicos foi realizada por UPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>, tendo sido identificados 27 compostos fenólicos (12 ácidos fenólicos e 15 flavonóides), para além de 2 compostos isoprenóides (isómeros do ácido abscísico). As amostras anteriormente classificadas como méis monoflorais de urze apresentaram uma maior quantidade de ácidos fenólicos relativamente aos compostos da classe dos flavonóides.

#### Capítulo IV – Conclusão e perspetivas de trabalho

---

Os compostos mais abundantes foram mesmo os isómeros do ácido abscísico, considerados como indicadores de origem botânica para o mel de urze, e que foram detetados em todas as amostras, à exceção da amostra A1, onde não foi detetado. Este fato, aliado ao resultado da análise melissopalinológica e à elevada condutividade apresentada por este mel reforçam a possibilidade de estarmos na presença de um mel monofloral de castanheiro. O ácido *p*-cumárico, derivado do ácido cinâmico, e o di-hidroflavonol éter de 5-metil-pinobanksina foram os compostos detetados.

Através da extração dos compostos voláteis por SPME e respetiva análise por GC-MS foi possível detetar cinquenta e nove compostos pertencentes a várias famílias químicas. Tendo por base as percentagens de área relativa, os compostos voláteis mais abundantes foram os terpenos hotrienol, timol e o óxido de *cis*-linalol, e também o aldeído nonanal.

Neste trabalho foram ainda avaliadas as propriedades de escoamento e reológicas do mel uma vez que, não existindo muitos estudos que abordem este aspeto, são propriedades bastante importantes na avaliação da qualidade feita pelo consumidor e na caracterização dos méis. O estudo das propriedades de escoamento, realizado com recurso a um viscosímetro de cilindros concêntricos, evidenciou que, de uma forma geral, as amostras de mel estudadas comportaram-se como fluídos Newtonianos, independentemente da temperatura a que foram realizados os ensaios. No entanto, as amostras A0, A3, A5, A7 e A8 apresentaram um comportamento pseudoplástico quando ensaiadas a 25 e/ou 35 °C e comportamento tixotrópicos, as amostras A2 e A5, a estas mesmas temperaturas. A avaliação das características reológicas, realizada através da utilização do texturómetro, mostrou que a amostra A1 (região de Chaves) apresentou os maiores valores para os parâmetros avaliados (coesividade, consistência, firmeza e índice de viscosidade), enquanto que a amostra A5 (região de Vila Real) foi a que apresentou menores valores. Verificou-se ainda a existência de uma boa correspondência entre os valores de viscosidade determinados com recurso ao viscosímetro e os valores do índice de viscosidade, obtidos através da utilização do texturómetro.

## **Perspetivas de trabalho**

Este trabalho pretendeu contribuir para a caracterização e avaliação dos méis monoflorais de urze. Os resultados obtidos sugerem que algumas das amostras não correspondem a méis monoflorais de urze e que, deste modo, seria importante a confirmação destes resultados através da análise de mais amostras desses méis. Deste trabalho, também se torna evidente a importância da utilização de várias técnicas analíticas para a confirmação da autenticidade de produtos alimentares, como é o caso do mel. Na continuação deste trabalho será importante aumentar o número de amostras para identificar potenciais marcadores florais dos méis de *Erica sp.*, nomeadamente através da avaliação do perfil em compostos fenólicos e em compostos voláteis, com recurso à utilização de técnicas de análise estatística.



# Capítulo V



## Referências bibliográficas



## Referências Bibliográficas

- [1] FAO (1996) Food and Agriculture Organization. Manual - Value-added products from beekeeping. Website: ([www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm](http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm)). data de acesso (22/02/2017)
- [2] Crane, E. (2009). Encyclopedia of Insects (Second Edition). *Beekeeping*. 19, 66-71.
- [3] Pisani, A., Protano, G., Riccobono, F. (2008). Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*, 107, 1553–1560.
- [4] Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A.G. (2002). Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c. p. 530–533.
- [5] Comissão Europeia. (2015). Agricultura e Desenvolvimento Rural: *Beekeeping and honey*, website: ([http://ec.europa.eu/agriculture/honey\\_pt](http://ec.europa.eu/agriculture/honey_pt)); data de acesso (17/02/2017)
- [6] González, G., Hinojo, M. J., Mateo, R., Medina, A., Jiménez, M. (2005). Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 1-9.
- [7] Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping. Rome: FAO. FAO *Agricultural Services Bulletin*, 124, 87-113.
- [8] Correia-Oliveira, M. E., Ferreira, A. F., Poderoso, J. C. M., Araújo, E.D., Carnelossi, M. A. G., Ribeiro, G. T., (2008). Actividade de água (aw) em amostras de pólen apícola desidratado e mel do estado de Sergipe. *Revista da Fapese*, 4, 27-36.
- [9] LeBlanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., DeLucca, A., Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, 115, 1299-1305.
- [10] Estevinho, L. M., Rodrigues, S., Pereira, A. P., Feás, X. (2012). Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 429-435.

## Capítulo V – Referências bibliográficas

---

- [11] Luz, C. F. P., Junior, G. L. B., Fonseca, R. L. S., Sousa, P. R. (2010). Comparative pollen preferences by africanized honeybees *Apis mellifera L.* of two colonies in Parána de Minas, Minas Gerais, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82, 293- 304.
- [12] Casaca, J. (2010). FNAP- Manual de produção de pólen e própolis. Website: ([http://www.fnap.pt/gestor/doc\\_up/documento\\_cnt\\_projectos\\_151.pdf](http://www.fnap.pt/gestor/doc_up/documento_cnt_projectos_151.pdf)); data de acesso (09/03/2017)
- [13] Barros, A. I., Nunes, F., Ferreira da Costa, M. (2009). FNAP. Manual de boas práticas na produção de cera de abelha. 12-13.
- [14] Carlos, M. C. (2004). Palinología y Carácteres Físico- Químicos del Pólen Apícola Producido en España. Propuesta de Parámetros objetivos de calidad. Tese Doutoramento em Química analítica, Nutrição y Bramatología. Universidade de Salamanca, Faculdade de Farmácia; Salamanca; Espanha.
- [15] Bogdanov, S. (2014). Beeswax Book, Chapter 1. Bee Product Science. Website: (<http://www.bee-hexagon.net/en/wax.htm>); data de acesso (09/03/2017)
- [16] Pereira, A. S., Seixas, F. R. M. S., Neto, F. R. A. (2002). Propólis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25 (2): 321-326.
- [17] Sabatini, A., Carpana, E. (2002). Apicultura, o sabor de uma história. Os produtos da apicultura. Bragança: Corane.
- [18] Ferreira, M., Andrade, P., Oliveira, M., Ferreira, I., Leitão, R., Seabra, R. (1997). Os compostos fenólicos como possíveis marcadores da autenticidade dos produtos de origem vegetal, *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 1, 4, 56-63.
- [19] Simuth, J. (2001). Some properties of the main protein of honeybee (*Apis Mellifera*) Royal Jelly. *Apidology*. 32, 69-80.
- [20] Barnutiu, L. I., Marghitas, L. A., Dezmirean, D. S., Mihai, C. M., Bobis, O., (2011). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Royal Jelly – Review, *Animal Science and Biotechnologies*. 44 (2). p. 67-71.

## Capítulo V – Referências bibliográficas

---

- [21] Benfenati, L., Sabatini, A G., Nanetti, A. (1986). Composizione in Sali minerali della gelatina reale. *Apicoltura*. 2. p. 129 – 143.
- [22] Ramadan, M. F., Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly. *Journal of Functional Foods*. p. 39-52.
- [23] 66 European Honey Directive. (2001). Official Journal of the European Communities. Website: (<http://www.ihc-platform.net/publications.html>).
- [24] Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, Diário da República nº 216 –I<sup>a</sup> Série A, Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas. (Lisboa).
- [25] GPP.(2016) Programa Apícola Nacional.(2017-2019 )-Junho
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J. F., Simal, J. (1992). Evaluating soluble and insoluble ash, alkalinity of soluble and insoluble ash and total alkalinity of ash in honey using electrical conductivity measurements at 20 °C. *Apidologie*, 23, 291-297.
- [29] Andrade, P. B., Roque, O. L., Cunha, P. (1994 ). Caracterization of portuguese honeys by their phenolic acids composition. *Polyphen*. Actual., (11), 52.
- [30] Codex Alimentarius Commission. (1981). Revised Codex Standard for Honey; Codex STAN, 12-1981, Rev. 1 1987, Rev. 2. 2001.
- [31] Bogdanov, S. (2002). Harmonised Methods of the International Honey Commission. 1-62.

Capítulo V – Referências bibliográficas

---

- [32] 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.
- [33] Gonnet, M., Vache, G. (1985). Le Gout du miel. Edition U.N.A.F, Paris.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] Sodré, G. S., Marchini, L. C., Moreti, A. 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.
- [37] Cuevas-Glory, L. F., Pino, J. A., Santiago, L. S., Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey, *Food Chemistry*, 103(3):1032-1043
- [38] 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*, 35:26-37
- [39] Gómez-Pajuelo, A. (2012). Análises Sensoriais de Méis. Disponível em: ([www.oapicultor.com/artigos/txt%20sensor%20meis](http://www.oapicultor.com/artigos/txt%20sensor%20meis)).
- [40] Tosi, E., Ré, E., Lucero, H., Bulacio, L. (2004). Effect of honey high temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallization phenomena and fungal inhibition, *LWT – Food Science and Technology*, 37:669-678.
- [41] Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., Wahab, M. S. A. (2012). O ligosaccharides might contribute to the antidiabetic effect of honey: A review of the Literature. *Molecules*, 17, 248–266.
- [42] Iglesias, A., Feás, X., Rodrigues, S., Seijas, J. A., Vázquez, 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* **2012**, 17(7), 8561-8577.

- [43] Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Oriolia, M., Facino, R.M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric /fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185–191.
- [44] 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
- [45] White, J. W., Doner, L. W. (1980). Honey composition and properties. Beeking in the United States, *Agricultura handbook*, 335, 82-91.
- [46] Finola, M. S., Lasagno, M. C., Marioli, J. M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, 100, 1649-1653.
- [47] 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.
- [48] Moreira, R. F. A., De Maria, C. A. B. (2001). Glicídios no mel. *Química Nova*, 24 (4), 516-525.
- [49] Bogdanov, S., Ruoh, K., Oddo, L.P. (2004). Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, S4-S17.
- [50] Pavelková, A., Kačániová, M., Čuboň, J., Švecová, Z., Kňazovická, V., Felsöciová, S. (2013). Physicochemical and microbiological quality oh honey from Liptov Region. *Jornal of Microbiological, Biotechnology and Food Sciences*, 2, 1185-1193.
- [51] Iurlina, M. O., Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 297-304.

## Capítulo V – Referências bibliográficas

- [52] Pereira, A. P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., Estevinho, L. M. (2009). Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2057–2063.
- [53] Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63 (4), 549–562.
- [54] Missio da Silva, P., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196 309–323
- [55] NP EN 1307 (1983) (2<sup>a</sup> edição). Mel: definição, classificação e características. Instituto Português da Qualidade.
- [56] Bogdanov, S. (1999). Honey quality and international regulatory standards: review by International Honey Comission. *Bee World*, 80, 61-69.
- [57] Estevinho, L. M., Feás, X., Seijas J. A., Vásquez-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.
- [58] Chakir, A., Romane, A., Barbagianni, N., Bartoli, D., Ferrazzi, P. (2011). Major and trace elements in different types of Moroccan honeys. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 223–231
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] De-Melo, A. A. M., Almeida-Muradian , L. B., Sancho, M. T., Pascual-Maté, A. (2017).Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review; *Journal of apicultural research*;
- [62] Pyrzynska, K., Biesaga, M. (2009) Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, No. 7.

- [63] Ferreres, F., García-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., Tomás- Barberán, F. **(1993)**. Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 61, 121–123.
- [64] Gil, M. I., Ferreres, F., Ortiz, A., Subra, E., Tomás-Barberáán, F. A. **(1995)**. Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2833–2838.
- [65] Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., Blázquez, M. A., Garcia- Viguera, C., Tomás-Lorente, F. **(1993)**. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 634, 41–46.
- [66] Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A. **(1997)**. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 60(1), 79–84.
- [67] Martos, I., Ferreres, F., Yao, L., D'Arcy, B., Caffin, N., Tomás-Barberán, F.A. **(2000)**. Flavonoids in monospecific eucalyptus honeys from Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4744–4748.
- [68] Cabras, P., Angioni, A., Tuberoso, C., Floris, I., Reniero, F., Guillou, C., Ghelli, S. **(1999)**. Homogentisic acid: A phenolic acid as marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4064–4067.
- [69] Dimitrova, B., Gevrenova, R., Anklam, E. **(2007)**. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solidphase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18, 24–32.
- [70] Cherchi, A., Spanedda, L., Tuberoso, C., Cabras, P. **(1994)**. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *Journal of Chromatography A*. 669: 59-64.
- [71] Küçük, M., Kolail, 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.

## Capítulo V – Referências bibliográficas

---

- [72] White, J. W., Maher, J. (1980). Hidroxymethylfurfural content of honey as an indicator of its adulteration with invert sugars. *Bee World*, 61, 29–37.
- [73] Nozal, M. a. J., Bernal, J. L., Toribio, L., Jiménez, J. J., Martín, M. A. T. (2001). Highperformance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, 917: 95-103.
- [74] Sancho, M. T. O. (1990). Estudio de las mieles producidas en la comunidad autonoma del Pais Vasco. Santiago de Compostela:. Tese de doutoramento. Faculdad de Farmacia.
- [75] Melo, Z. F. N., Duarte., M. E. M., Mata, M. E. R. (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.
- [76] Camargo, R. C. R., Pereira, F. M., Lopes, M. T. R., Wolff, L. F. (2006). Mel: características e propriedades. Teresina: *Embrapa Meio-Norte*, 29.
- [77] 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.
- [78] Bastos De Maria, C. A., Moreira, R. F. A. (2003). Compostos voláteis em méis florais -Revisão; *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 1, 90-96,
- [79] Steeg, E., Montag, A. (1987). Z. Nachweis aromatischer Carbonsäuren in Honig. *Lebensm. Unters. Forsch.* Cap.I, 17.184.
- [80] Castro-Vasquéz, 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.

Capítulo V – Referências bibliográficas

---

- [81] Bhandari, B., D'Arcy, B., Chow, S. (1999). Rheology of selected Australian honeys. *Journal of Food Engineering*, 41: 65-68.
- [82] Schramm, G. (2000). Practical Approach to Rheology and Rheometry. 2<sup>a</sup> Edition. *Gebrueder Haake*. pp. 15-19
- [83] Cohen, I., Weihs, D. (2010). Rheology and microrheology of natural and reducedcalorie Israeli honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. *Journal of Food Engineering*, 100: 366-371.
- [84] Fox, R. W.; Mcdonald, A. T. (1981). Introducao a Mecanica dos Fluidos. Editora Guanabara Dois, 2<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro, p.16-26.
- [85] Al-Mamary, M., Al-Meri, A., Al-Habori, M. (2005). Antioxidant activities and totalphenolics of different types of honey. *Food Chemistry*. (91), 313-317.
- [86] Weston, R. J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review, *Food Chemistry*, 71(2):235-239
- [87] Escuredo O., Míguez, M., Fernández-González, M., Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic área. *Food Chemistry* Volume 138, (2–3), 851-856
- [88] Feás, X., Iglesias, A., Rodrigues, S., Estevinho, L. M. (2013). Effect of Erica sp. Honey against Microorganisms of Clinical Importance: Study of the Factors Underlying this Biological Activity. *Molecules*, 18, 4233-4246;
- [89] Taormina, P. J., Niemira, B. A., Beuchat, L. R. (2001). Inibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power, *International Journal of Food Microbiology*, 69(3):217-225
- [90] Forcone, A., Aloisi, P. V., Ruppel, S., MuÑoz. (2011). Botanical composition and protein content of pollen collected by *Apis mellifera* L. in the north-west of Santa Cruz (Argentinean Patagonia). *Gran*, 50, 30-39.

- [91] Pires, S. M. A., Rodrigues, T., Rocha, A., Pajuelo, A., Pereira, O. (2005). Pollen spectra of honeys from Trás-os-Montes e Alto Douro. *Revista Portuguesa Zootecnia* XII, 1, 87-99.
- [92] Ferreres, F., Andrade, P., Tomás-Barberán, F. A. (1996). Natural Occurrence of Abscisic Acid in Heather Honey and Floral Nectar. *J. Agriculture. Food Chemistry.*, 44, 2053-2056
- [93] Adaptado de Wikipédia.  
([https://pt.wikipedia.org/wiki/Subdivis%C3%B5es\\_de\\_Portugal](https://pt.wikipedia.org/wiki/Subdivis%C3%B5es_de_Portugal)); data de acesso (22/07/2017)
- [94] Von Der Ohea, W., Oddob, L. P., Pianab, M. L., Morlotc, M., Martind, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35 S18–S25
- [95] Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., Estevinho, L. M. (2012). Commercial Bee Pollen With Different Geographical Origins: A Comprehensive Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 11173-11187.
- [96] 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.
- [97] Falcão, S., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 396, 887-897.
- [98] 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.
- [99] Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., Mafra, I. (2017). A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: production and Origin comprehensive. *Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 00.

## Capítulo V – Referências bibliográficas

---

- [100] Escuredo, O., Dobre, I., González, M. F., Seijo, M. C. (2014) Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*. 149, 84–90.
- [101] Simal, J., Huidobro, J., Araquistain, J. L. (1983). Parámetros de calidad de la miel: determinación del contenido en agua [Quality parameters of honey: Determination of water content]. *Offarm*. 2, 243–248.
- [102] 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
- [103] Yücel, Y., Sultanoglu, P. (2013). Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES combined with chemometrics. *Food Chemistry*. 140, 231–237.
- [104] Feás, X., Pires, J., Iglesias, A. e Estevinho, M. L. (2010). Characterization of artesanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3462-3470.
- [105] N. Czipa, B. Kovács. (2014). Electrical conductivity of hungarian honeys. *J. Food Physics*, Vol.27, 13-20
- [106] Gomes, S., Dias, L. G., Moreira, L. L., Rodrigues, P. e Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of comercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 544-548.
- [107] Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*. v. 103, 601–606.

## Capítulo V– Referências bibliográficas

---

- [108] Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto M.C., González-Viñas, M. A., de la 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*. v. 56, 1999–2006.
- [109] Fallico, B., Arena, E., Verzera, A., Zappala, M. (2006). The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation and Quality Assurance*, 11, 49–54.
- [110] Capuano, E., Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Food Science and Technology*. v. 44, 793-810.
- [111] Feás, X., Pires, J., Estevinho, M. L., IglesiaS, A. J., Araujo, P. (2010). Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1255–1262.
- [112] Spano N., Piras I., Ciulu, M., Floris I., Panzanelli A., Pilo M. I., Piu, P. C., Sanna G. (2009). Reversed-phase liquid chromatographic profile of free amino acids in strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. AOAC Internat.*, 92, 1145–1152.
- [113] Nozal M. J., Bernal J. L., Toribio M. L., Diego J. C., Ruiz A. (2004). Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 1047, 137–146.
- [114] Janiszewska1, K., Aniołowska, M., Nowakowski1 P. (2012). Free Amino Acids Content of Honeys from Poland. *Food Chemistry Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 62, (2), pp. 85-89.
- [115] Andrade, P. B., Batista, M. T., Amaral, M. T., Carvalho, J. C. M. F., Seabra, R. M.,

## Capítulo V – Referências bibliográficas

Proença da Cunha, A. (2001). Determination of sugar composition in portuguese heather honeys by HPLC/RI. APIMONDIA.

[116] Bath, P. K., Singh, N. A. (1999) Comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey, *Food Chemistry*, 67 (4), 389-397.

[117] Falcão, S. I., Tomás, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., Vilas-Boas, M. (2013) . Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese própolis. *Industrial Crops and Products*. 49, 805– 812.

[118] Falcão, S. I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M. R. M., Freire, C., Cardoso, S. M., et al., (2013). Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC–MS spectrometry: uncommon propolis rich with flavonoid glycosides. *Phytochem Anal.* 24 (4), 309-318.

[119] Bertoncelj, J., Polak, T., Kropf, U., Korosčec, M., Golob, T. (2011). LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chemistry*. 127, 296–302

[120] Marcelo, D., Catarino, J. M., Alves-Silva, Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Jordão, M., Cardoso, S. M. (2016). Chapter 4 “Chromatography as a tool for Identification of bioactive compounds in honeybee products of botanical origin”, Applications of Honeybee Plant-Derived Products. v. 1, 86-143.

[121 ] Tomás-Barberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 81, 485–496.

[122] Kenjerić D., Mandić, M. L., Primorac, L., Bubalo, D., Perl, A. (2007) Flavonoid profile of *Robinia* honeys produced in Croatia *Food Chemistry*. 102(3).

Capítulo V – Referências bibliográficas

---

- [123] Barras; M. P. G., Ponce-Díaz, M. C., Venegas-Gallegos, C. (2010) Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble Province, Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research.* v. 70, 75-84.
- [124] Bastos, D. H. M., Franco, M. R. B., da Silva, M. A. A. P., Janzanti, N. S., Marquez, M. O. M. (2002) Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de Eucalipto e Laranja, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 22 (2), 122-129.
- [125] Cui, H., Jia, C., Hayat, K., Yu, J., Deng, S., Karangwa, E., Duhoranimana, E., Xiaa, S., Zhang, X. (2017). Controlled formation of flavor compounds by preparation and application of Maillard reaction intermediate (MRI) derived from xylose and phenylalanine. *RSC Advances.* 7, 45442.
- [126] Magalhães, M., Castro, M., Afonso, M., J., Ramalhosa, E. (2012). Efeito da temperatura no comportamento reológico de méis colhidos na região nordeste de Portugal. 11º Encontro de Química dos Alimentos.
- [127] Schramm, G. (2006). *Reologia e reómetria.* 2 ed. Rio de Janeiro: Artliber Editora Ltda., 232.
- [128] Soria, A. C., González, M., Lorenzo, C., Martínez-Castroa, I., Sanza, J. (2004). Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chemistry.* 85, 121–130

# Capítulo VI



## Anexos



Em anexo seguem-se quatro resumos que resultaram de duas comunicações em painel e duas comunicações orais.

### **Comunicações em painel**

**Elsa Caveiro**, Soraia I. Falcão, Andreia Tomás, M. Carmen Seijo, Vitor Manuel R. Martins, Miguel Vilas-Boas. Avaliação do perfil em açúcares do mel de urze (*Erica spp.*) comercial português. Congresso 12<sup>a</sup> Reunião do Grupo de Glúcidos, 11-13 Setembro 2017, Aveiro, Portugal.

**Elsa Caveiro**, Soraia I. Falcão, Andreia Tomás, Vítor Martins, Miguel Vilas-Boas. Valorização do mel de urze (*Erica spp.*) português: Caracterização físico-química e avaliação da atividade antioxidante. II Congresso Nacional das Escolas Superiores Agrárias de 16-18 de Novembro de 2017, Elvas, Portugal.

### **Comunicação oral**

**Caveiro, Elsa**; Falcão, Soraia I.; Tomás, Andreia; Martins, Vitor Manuel R.; Vilas-Boas, Miguel. Composição e caraterização do mel de urze (*Erica spp.*) português. Encontro dos Jovens Investigadores, 29 de novembro 2017, Bragança, Portugal.

**Soraia I. Falcão**, Elsa Caveiro, Paulo Russo-Almeida, M. Carmen Seijo, Vitor Martins e Miguel Vilas-Boas. The volatile profile for discrimination of lavender and heather honey, using solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. 10<sup>a</sup> Encontro Nacional de Cromatografia, 4-6 de Dezembro 2017, Bragança, Portugal.

## Avaliação do perfil em açúcares do mel de urze (*Erica spp.*) comercial português

**Elsa Caveiro,<sup>1</sup> Soraia I. Falcão,<sup>1</sup> Andreia Tomás,<sup>1</sup> M. Carmen Seijo,<sup>2</sup> Vitor Manuel R. Martins,<sup>1</sup> Miguel Vilas-Boas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>.CIMO - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal;

<sup>2</sup>. Departamento de Bioloxia Vexetal e Ciencia do Solo, Faculdade de Ciencias, Universidade de Vigo, Campus As Lagoas, 32004 Ourense, Spain

As abelhas são um exemplo de sucesso evolucionário dos seres vivos, existindo há mais de 125 milhões de anos, e com a capacidade de explorar virtualmente todos os habitats da terra. O mel é uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas a partir do néctar de flores, de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam no favo de mel para amadurecer [1].

O mel é uma solução supersaturada de açúcares cujos compostos maioritários são a frutose e a glucose. Os monossacáridos representam cerca de 75 % dos açúcares encontrados no mel, seguidos dos dissacáridos e, numa menor proporção, de trissacáridos. Os açúcares são responsáveis por diversas propriedades do mel como: valor energético, viscosidade, higroscopidade, rotação específica, granulação e poder adoçante [1]. A sua proporção depende maioritariamente da origem botânica e geográfica do mel, mas as condições climáticas, o processamento e armazenamento do mel também influenciam a sua composição [1,2]. As concentrações de frutose e glucose, bem como a sua relação são indicadores úteis na classificação dos méis.

Este trabalho teve como objetivo o estudo do perfil em açúcares de 12 amostras comerciais de mel de urze (*Erica spp.*) Português. A predominância do pólen de urze foi aferida através de análise polínica de acordo com o descrito na literatura [2]. A análise dos açúcares foi efetuada por cromatografia líquida de alta pressão com detetor de índice de reflecção (HPLC-RI), utilizando uma calibração por padrões externos. No estudo da predominância polínica verificou-se a existência de pólen de urze em 10 amostras, numa percentagem entre 1,2 % e 46,6%, com uma amostra proveniente de Boticas a apresentar

o maior valor. O perfil em açúcares das amostras é semelhante, encontrando-se a frutose como o monossacárido mais abundante seguido da glucose, representando estes dois açúcares no seu conjunto um valor superior a 60%, o que é indicador de mel de néctar [1]. Outros açúcares, entre os quais turanose, maltulose, maltose, trealose, kojibiose e erlose, foram encontrados em menor percentagem.

*Acknowledgements:* The authors are grateful to the Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) and FEDER under Programme PT2020 for financial support to CIMO (UID/AGR/00690/2013). Soraia I. Falcão thanks FCT for the Post-Doc grant SFRH/BPD/118987/2016.

1. P. Missio da Silva, C. Gauche, L. V. Gonzaga, A. C. O. Costa, Food Chem, **2016**, *196*, 309-323;
2. O. Escuredo, I. Dobre, M. Fernández-González, M. C. Seijo, Food Chem, **2014**, *149*, 84–90;

P 14

CIMD INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA Escola Superior Agrária

UNIVERSIDADE DE VIGO

QOPNA Universidade de Aveiro

GLU POR

**Avaliação do perfil em açúcares do mel de urze comercial português (*Erica spp.*)**

**Elsa Caveiro,<sup>1</sup> Soraia I. Falcão,<sup>1</sup> Andreia Tomás,<sup>1</sup> M. Carmen Seijo,<sup>2</sup> Vitor Manuel R. Martins,<sup>1,3</sup> Miguel Vilas-Boas<sup>1</sup>**

1. CIMD - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal; 2. Departamento de Biología Vegetal e Ciencia do Solo, Facultade de Ciencias, Universidade de Vigo, Campus As Lagoas, 32004 Ourense, Espanha; 3. QOPNA, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.

**Introdução**

**Figura 1.** Origem das amostras e espécies de urze estudadas

O mel é um dos produtos obtidos da colmeia com maior expressão devido às suas propriedades nutricionais e terapêuticas. Entre os vários melis monoflorais produzidos em Portugal o de urze é dos mais consumidos. É uma solução supersaturada de açúcares cujos compostos maioritários são a frutose e a glucose. Os monossacáridos representam cerca de 75 % dos açúcares encontrados no mel, seguidos dos dissacáridos e, numa menor proporção, de trissacáridos. Entre os vários melis monoflorais produzidos em Portugal o de urze é dos mais consumidos.

Este trabalho teve como objetivo o estudo do perfil em açúcares de 12 amostras comerciais de mel de urze (*Erica spp.*) proveniente de sete regiões diferentes de Portugal (Figura 1).

**Métodos**

➤ A predominância do pólen de urze foi aferida através de análise polínica (Figura 2).

➤ O perfil de açúcares foi determinado por cromatografia líquida de alta pressão com detector de índice de refração (HPLC-RI), utilizando-se padrões externos (Figura 3).

**Figura 2.** Análise polínica

**Figura 3.** Preparação das amostras e análise.

**Resultados e discussão**

**Figura 4.** Perfil cromatográfico dos açúcares encontrados no mel de urze comercial português

**Tabela 1.** Composição em açúcares do mel de urze comercial português

Regiões	Amostras	% Açúcares					
		Frutose	Glucose	Sacarose	Frutose + Glucose	Frutose / Glucose	Glucose / Humidade
Ciimbra	A	39,6 ± 0,0	31,2 ± 0,1	-	70,8	1,3	2,0
Chaves	A1	39,6 ± 2,2	29,4 ± 0,1	-	68,9	1,3	2,1
	A2	39,9 ± 0,2	28,4 ± 0,0	-	68,4	1,4	1,9
Aveiro da Beira	A3	41,8 ± 0,8	35,7 ± 0,9	-	77,5	1,2	2,3
	A4	38,0 ± 0,3	25,7 ± 0,3	-	63,0	1,5	1,6
Vila Real	A5	37,9 ± 0,3	25,6 ± 0,3	-	80,1	1,2	2,1
	A6	41,7 ± 0,5	33,2 ± 0,1	-	74,9	1,3	2,1
Beira	A10	39,8 ± 0,0	32,4 ± 0,0	-	72,2	1,2	2,0
	A11	38,4 ± 3,2	30,2 ± 2,0	-	69,0	1,3	2,0
Pantera	A7	38,0 ± 0,3	28,8 ± 0,6	-	66,8	1,3	1,8
Lousã	A8	40,8 ± 2,4	30,7 ± 1,7	-	71,4	1,3	2,0
	A9	39,8 ± 1,7	30,7 ± 1,2	-	70,6	1,3	1,9

➤ No estudo da predominância polínica verificou-se a existência de pólen de urze em 10 amostras, numa percentagem variável entre 1 % e 47%, correspondendo o maior valor à amostra de Boticas.

➤ A análise permitiu identificar oito açúcares, em que os mais abundantes foram os monossacáridos frutose e glucose, com teores superiores a 70 % característicos de mel de néctar (Tabela 1).

➤ Foram também identificados dissacáridos como a turanose, maltulose, maltose, trealose e kogibose em todas as amostras, embora em menor proporção (Figura 4). Além destes compostos, identificaram-se os trissacáridos erlose e melezitose nas amostras A1 e A3, cuja predominância polínica de *Erica spp* verificou ser menor que 3%.

➤ Na relação glucose/humidade, o valor apresentado pelas amostras é superior a 1,5%, indicando alguma tendência para cristalizar.

➤ Estudou-se a predominância polínica de urze em 12 melis provenientes de diferentes regiões de Portugal, verificando-se que uma elevada percentagem das amostras não cumpre os critérios de monofloralidade (teor de pólen de urze superior a 45%).

➤ O perfil de açúcares confirmou os melis como mel de néctar, com alguma tendência para cristalizar.

➤ Nos melis com menor quantidade de pólen de urze, verificou-se uma maior concentração de dissacáridos e trissacáridos, estes últimos ausentes nos melis com uma maior predominância polínica de *Erica spp*.

**Conclusões**

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) e ao FEDER pelo programa PT2020 pelo financiamento ao CIMD (UDI/AGA/006/00/2013). Soraia I. Falcão agradece à FCT e Universidade de Vigo.

---

## Valorização do mel de urze (*Erica spp.*) português: caracterização físico-química e avaliação da atividade antioxidante

**Elsa Caveiro, Soraia I. Falcão, Andreia Tomás, Vítor Martins, Miguel Vilas-Boas**

*Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal*

O mel é um alimento natural bastante valorizado pelos consumidores pelas suas propriedades nutritivas e terapêuticas. Produzido pelas abelhas a partir do néctar de flores, de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insectos sugadores de plantas, a sua composição é complexa e variável dependendo da sua origem [1]. O mel de urze, proveniente da floração de urzes (*Erica spp.*), é um produto apícola característico das terras altas e montanhosas de Portugal. Carateriza-se por ser um mel de cor escura, consistência densa, aroma intenso e persistente, com um gosto ligeiramente amargo próprio do néctar de urze. É um mel intensamente mineralizado e rico em compostos fenólicos pelo que possui uma maior capacidade antioxidante que o distingue de outros méis.

Este trabalho teve como objetivo contribuir para a valorização do mel de urze (*Erica spp.*) português através da avaliação dos seus parâmetros de qualidade do mel. Para isso avaliaram-se os parâmetros físico-químicos (humididade, pH, acidez, condutividade, cor, HMF, índice diastásico, prolina, e composição fenólica) e a atividade antioxidante (poder redutor e bloqueador de radicais livres) de 12 amostras de mel de urze (*Erica spp.*) provenientes de seis áreas geográficas distintas de Portugal. Os méis estudados apresentaram uma cor situada entre âmbar claro a âmbar escuro, com um teor de humidade entre 14,1 e 17,5% e valores de HMF baixos a médios. Estes méis têm uma acidez mais elevada, relacionada com a presença de ácidos orgânicos, frequente em méis escuros e uma condutividade média a elevada, indicativo da sua alta mineralização. Para além disso, apresentaram um alto conteúdo natural em enzimas com valores entre 12 e 19 DN. Ao nível da composição fenólica, e como é frequentemente verificado para os méis escuros, o teor em compostos fenólicos é elevado, refletindo-se numa atividade antioxidante também elevada. Através da técnica de LC-MS foi possível efetuar uma caracterização específica do perfil fenólico, identificando-se 20 compostos, entre ácidos

## Capítulo VI– Anexos

---

fenólicos (ácido *p*-hidroxibenzóico e seus derivados, ácido salicílico, ácido cafeico e ácido cumárico), flavonóides (quercetina e seus derivados, pinobanksina e seus derivados, campferol e seus derivados, crisina, pinocembrina e galangina) e o ácido abscísico em conjunto com dois dos seus isómeros, sendo estes últimos os mais abundantes, e descritos na literatura como marcadores para este tipo de mel [2].

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) e ao FEDER sob o programa PT2020 pelo financiamento ao CIMO (UID/AGR/00690/2013).

[1] Missio da Silva, P, Gauche, C, Gonzaga, LV, Costa, ACO, Food Chem, **2016**, *196*, 309-323.

[2] Jasicka-Misiak, I, Poliwoda, A, Deren, M, Kafarski P, Food Chem, **2012**, *131*, 11149-1156.

## Valorização do mel de urze (*Erica spp.*) português: caracterização físico-química e avaliação da atividade antioxidante

Elsa Caveiro<sup>1</sup>, Soraia I. Falcão<sup>1</sup>, Andreia Tomás<sup>1</sup>, Vítor Martins<sup>1</sup>, Miguel Vilas-Boas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal



### Introdução

O mel é um alimento natural bastante valorizado pelos consumidores pelas suas propriedades nutritivas e terapêuticas. O mel de urze, proveniente da floração de urzes (*Erica spp.*), é um produto apícola característico das terras altas e montanhosas de Portugal. Carateriza-se por ser um mel de cor escura, consistência densa, aroma intenso e persistente, com um gosto ligeiramente amargo próprio do néctar de urze. Este trabalho teve como objetivo contribuir para a valorização do mel de urze (*Erica spp.*) português através da avaliação dos seus parâmetros de qualidade do mel.



**Tabela 1**- Parâmetros físico – químicos.

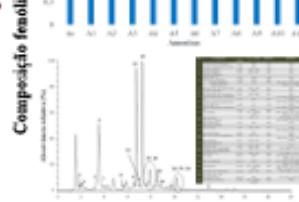
Parâmetro	Me	Ac	DN	MF	TPC	TPA	DN												
Densidade	Me	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
Acidez	Me	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
DN	Me	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
MF	Me	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
TPC	Me	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
TPA	Me	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
DN	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
MF	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
TPC	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
TPA	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
DN	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
MF	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
TPC	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
TPA	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
DN	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
MF	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
TPC	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
TPA	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040
DN	Ac	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040	1.040

### Conclusão

Os méses estudados apresentaram uma cor situada entre âmbar claro e âmbar escuro, com um teor de humidade entre 14,1 e 17,5% e valores de HMF baixos a médios. Estes méses têm uma acidez mais elevada, relacionada com a presença de ácidos orgânicos, frequente em més escuros e uma condutividade média a elevada, conteúdo natural em enzimas com valores entre 12 e 19 DN. Ao nível da composição fenólica, e como é frequentemente verificado para os méses escuros, o teor em compostos fenólicos é elevado, refletindo-se numa atividade antioxidante também elevada. Através da técnica de LC-MS foi possível efetuar uma caracterização específica do perfil fenólico, identificando-se 20 compostos, entre ácidos fenólicos, flavonoides e o ácido abscisico em conjunto com dois dos seus isômeros, sendo estes últimos os mais abundantes, e descritos na literatura como marcadores para este tipo de mel.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) e ao FEDER sob o programa PT2020 pelo financiamento ao CIMO (UID/AGL/00690/2013).

**Figura 1**- Cromatograma da amostra Ac.



## Composição e caracterização do mel de urze (*Erica spp.*) português

**Caveiro, Elsa<sup>1</sup>; Falcão, Soraia I.<sup>2</sup>; Tomás, Andreia<sup>3</sup>; Martins, Vitor Manuel R.<sup>4</sup>; Vilas-Boas, Miguel<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> *elsa\_caveiro@hotmail.com, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal*

<sup>2</sup> *sfalcao@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal*

<sup>3</sup> *tomas@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal*

<sup>4</sup> *vmartins@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal*

<sup>5</sup> *mvboas@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal*

### Resumo

O mel de urze (*Erica spp.*), é um produto apícola que possui alto valor nutricional, antimicrobiano e antioxidante. Este trabalho teve como objetivo a caracterização de 12 amostras de mel de urze (*Erica spp.*) português proveniente de sete áreas geográficas de Portugal, através da avaliação dos seus parâmetros de qualidade. Para isso avaliaram-se os parâmetros físico-químicos (humididade, pH, acidez, condutividade, cor, HMF, índice diastásico, prolina, composição fenólica e perfil volátil), os parâmetros nutricionais (proteínas, hidratos de carbono e energia), a atividade antioxidante (DPPH e poder redutor), o perfil em açúcares e as propriedades reológicas. As amostras analisadas apresentaram comportamento Newtoniano ou pseudoplástico, com uma cor entre o âmbar claro a âmbar escuro, um teor de humidade entre 14,1 e 17,5%, valores de HMF baixos a médios, uma acidez elevada devido à presença de ácidos orgânicos, uma condutividade média, uma alta mineralização e valores de enzimas entre 12 e 19 DN. O perfil em açúcares foi avaliado por HPLC-RI, em que os monossacáridos (frutose e glucose) representam mais de 60 % de teor em açúcares. A técnica de LC-MS permitiu identificar vinte compostos fenólicos, entre ácidos fenólicos e flavonóides, destacando-se o ácido abscísico, marcador floral para este tipo de mel. Através de SPME/GC-MS foram identificados setenta compostos voláteis, dos quais se destacam os isómeros de óxido de linalol, o hotrienol e o 2-fenil-etanol.

**Palavras-Chave:** *Apis mellifera*; mel; parâmetros físico-químicos; compostos fenólicos; composição volátil.

## The volatile profile for discrimination of lavender and heather honey, using solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry

**Soraia I. Falcão<sup>a</sup>, Elsa Caveiro<sup>a</sup>, Paulo Russo-Almeida<sup>b</sup>, M. Carmen Seijo<sup>c</sup>, Vitor Martins<sup>a</sup> e Miguel Vilas-Boas<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

<sup>b</sup>Laboratório Apícola - LabApis<sup>utad</sup>, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Departamento de Zootecnia, 5000-801 Vila Real, Portugal

<sup>c</sup>Departamento de Bioloxía Vexetal e Ciencia do Solo, Facultade de Ciencias, Universidade de Vigo, Campus As Lagoas, 32004 Ourense, Spain

[\\*mvboas@ipb.pt](mailto:mvboas@ipb.pt)

Honey is a natural product produced by *Apis mellifera* bees from the nectar or secretions of plants, which has a long history of human consumption. It is also used in various foods and beverages as a sweetener and flavouring. The main parameters of honey quality, which also influence its price, are derived from its botanical origin. Honey volatiles have been used as markers for its authenticity. They may arise from the nectar source, from the transformation of plant compounds by the honeybee, directly generated by honeybee, from heating or handling during honey processing and storage or from microbial or environmental contamination [1].

The aim of this work is the discrimination of monofloral *Lavandula* spp. and *Erica* sp. honeys through its volatile profile. For that, eighteen samples from both lavender and heather honey, were analyzed. Volatiles were sampled by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) using a 65 µm polydimethylsiloxane divinylbenzene (PDMS/DVB) fiber. The chemical identification was performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A complex total ion chromatogram was obtained, with nearly seventy compounds identified and quantified. The aldehydes and terpenic derivatives were the most likely to relate honey to its floral origin, being phenylacetaldehyde and nonanal the most representative in lavender honey while hotrienol was the most abundant in the heather honeys. The above methodology was suitable for the isolation of low-molecular-weight aroma compounds, particularly for the short-chain aliphatic compounds that are important for authentication of lavender and heather honey.

### Acknowledgements:

Soraia I. Falcão thanks FCT for the Post-Doc grant SFRH/BPD/118987/2016 and IACOBUS program for financing her stay in Vigo University. The authors are grateful to the Foundation for Science and Technology (FCT, Portugal) and FEDER under Programme PT2020 for financial support to CIMO (UID/AGR/00690/2013). Thanks to Portuguese Beekeepers National Federation for honey samples supply.

### References:

- [1] E. de la Fuente, I. Martínez-Castro, J. Sanz. J. Sep. Sci. 2005, 28, 1093-1100.