



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2017

**Ana Filipa Matos
Esteves**

**Análise e caracterização de perfis voláteis de méis
com e sem aromatização**



**Ana Filipa Matos
Esteves**

**Análise e caracterização de perfis voláteis de méis
com e sem aromatização**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Elisabete Verde Martins Coelho, Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais.

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutora Elisabete Coelho e Professor Doutor Manuel António Coimbra, pelos conhecimentos transmitidos e orientação científica.

Às fundadoras da Beesweet expresso, igualmente, os meus agradecimentos pela oportunidade concedida.

Ao Instituto Politécnico de Bragança, em especial à Professora Doutora Maria Letícia Estevinho, pela disponibilidade para a realização da análise polínica.

Aos meus Pais por toda a formação que me proporcionaram e por serem o meu porto de abrigo.

Aos meus queridos Avós, por todo o carinho e orgulho em mim.

À minha melhor amiga, Flávia Vicente, por ter estado sempre do meu lado, desde o 3º ciclo.

Aos meus amigos, Rita Pina e André Gabriel, por me acompanharem desde a entrada no mundo universitário.

À minha amiga Ana Marques por toda a companhia e amizade sincera nestes 2 anos.

A todos os meus amigos, em geral, pela amizade e apoio nos bons e maus momentos, ao longo destes anos.

palavras-chave

mel, origens florais, aromas, composição volátil, análise polínica, HS-SPME/GC-qMS

resumo

O mel é uma substância doce natural produzida pelas abelhas *Apis mellifera*. Os tipos de mel obtidos de diferentes origens florais apresentam aromas e sabores distintos devido à sua diferente composição volátil. Apesar de estarem presentes em baixas concentrações, os compostos voláteis contribuem para o aroma e para as propriedades benéficas do mel.

O objetivo deste estudo foi a caracterização da composição volátil de seis méis aromatizados (canela, chocolate, limão, menta, picante e salgado) e três não aromatizados, fornecidos pela marca Beesweet. Para os méis não aromatizados (mel base, inverno e verão), procedeu-se também à análise polínica para determinar a respetiva origem botânica.

As amostras de mel foram caracterizadas de acordo com os seus parâmetros físico-químicos (pH e atividade da água) e pela capacidade antioxidante. Todas as amostras apresentaram valores dentro dos intervalos de referência. Algumas aromatizações (canela, chocolate, salgado e limão) contribuíram para um aumento da atividade da água. No que diz respeito à capacidade antioxidante, nas três amostras de mel sem aromatização, a que apresentou uma maior atividade foi o mel verão (8,25 μM de equivalentes de trolox/g de mel); das amostras de méis aromatizados foram a chocolate (8,01 μM de equivalentes de trolox/g de mel) e limão (6,95 μM de equivalentes de trolox/g de mel).

Pela análise polínica foi possível verificar que, das três amostras de mel sem aromatização, só uma pode ser classificada como mel monofloral, apresentando 89,1% de pólen de *Eucalyptus spp* (mel inverno) e as restantes como méis multiflorais.

A extração de compostos voláteis do mel foi realizada por microextração em fase sólida em espaço de cabeça e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo (HS-SPME/GC-qMS). No mel monofloral foi possível identificar compostos característicos do eucalipto, como o nonanal, o *p*-menta-1,5,8-trieno e o aromadendreno, sendo este último apenas identificado neste mel. No mel base, os compostos que apresentaram maiores áreas cromatográficas foram o nonanal e decanal. Já no mel verão os compostos que se destacaram foram o nonanal e 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidro-naftaleno. Nas aromatizações chocolate, picante e salgado, o composto que se destacou foi o nonanal, estando associado a aromas cítricos e picantes. Nos méis menta e canela foi o composto 1,8-cineol e no mel limão o limoneno, estando associados a aromas agradáveis e a possíveis propriedades benéficas. As aromatizações canela, limão e menta contribuíram para um aumento significativo dos compostos terpénicos, apresentando 18, 12 e 11 compostos, respetivamente, em comparação com o mel base que apresenta 5. Uma presença adicional destes compostos terpénicos confere aromas com descritores frutados, doces, picantes e cítricos a um mel base muito neutro em termos de aroma.

O estudo do perfil volátil permitiu a identificação dos principais compostos que contribuem para o aroma dos méis. Pela análise polínica foi possível verificar quais as famílias botânicas que deram origem aos méis.

keywords

honey, floral origins, aroma, volatile composition, pollen analysis, HS-SPME/GC-qMS

abstract

Honey is the natural sweet substance produced by *Apis mellifera* bees. The types of honey obtained from different floral origins present distinct aroma and flavour due to their different volatile composition. Despite present in low concentrations, volatile compounds contribute to the aroma and to the beneficial properties of honey.

This study aims to examine the volatile composition of six flavoured honeys (cinnamon, chocolate, lemon, mint, spicy and salty) and three unflavoured honeys provided by Beesweet. The pollen analysis is also taken into consideration to determine the floral origin, in the case of unflavoured honeys (Base, Winter and Summer honey).

The honey samples were characterized according to their physicochemical parameters (water activity and pH) and antioxidant activity. All samples presented values within the reference ranges. Certain varieties of flavoured honey (cinnamon, chocolate, lemon and salty) contributed to an increase in water activity. The unflavoured honey that presented the highest antioxidant activity was the Summer honey (8.25 μM trolox equivalent/g of honey); in the case of flavoured honeys, the highest antioxidant activity was found in the chocolate (8.01 μM trolox equivalent/g) and lemon (6.95 μM trolox equivalent/g) varieties.

After conducting a pollen analysis of the three samples of unflavoured honey, one sample was classified as monoflora, presenting 89.1% of *Eucalyptus spp* pollen (Winter honey), and the others as multiflora honeys.

The extraction of volatile compounds from honey was performed using the headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography-quadrupole mass spectrometry (HS-SPME/GC-qMS). In monoflora honey, it was possible to identify eucalyptus compounds such as nonanal, *p*-mentha-1,5,8-triene and aromadendrene (this last compound was only observed in this type of honey). In the Base honey, the compounds with higher chromatographic areas were nonanal and decanal. In the Summer honey, the most prominent compounds were nonanal and 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene. In the chocolate flavoured honey and spicy and salty variations, the compound with the highest value was nonanal, presenting citrus and spicy aromas. In the cinnamon and mint flavoured honeys, the highest values were for the 1,8-cineole compound, while the lemon flavoured honey had the presence in higher amount of limonene, both associated with pleasant aromas and potentially beneficial properties. The cinnamon, lemon and mint flavoured honeys contributed to a significant increase in the terpene compounds (18, 12, and 11 compounds, respectively), in contrast to the base honey that has 5 compounds. An additional presence of these terpene compounds confers fruity, sweet, spicy and citric flavours to the honey, which had a very neutral aroma.

The study of the volatile profile allowed the identification of the main compounds that contribute to the honey aroma. From the pollen analysis it was possible to verify their botanical families.

Índice

Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
Capítulo I: Introdução Teórica	1
1.1. Enquadramento geral.....	3
1.2. Empresa - More than Honey, Lda	4
1.3. Mel	5
1.3.1. Definição.....	5
1.3.2. Produção	5
1.3.3. Classificação	6
1.3.4. Aromatização	7
1.4. Composição.....	7
1.4.1. Hidratos de carbono	8
1.4.2. Água.....	8
1.4.3. Proteínas.....	9
1.4.3.1. Enzimas	9
1.4.3.2. Aminoácidos.....	10
1.4.4. Ácidos orgânicos.....	10
1.4.5. Compostos fenólicos.....	10
1.4.6. Compostos voláteis	11
1.4.6.1. Origem.....	11
1.4.6.2. Relação dos compostos voláteis com o aroma	11
1.4.6.3. Compostos voláteis presentes no mel.....	12
1.4.6.3.1. Compostos terpénicos	12
1.4.6.3.2. Norisoprenóides	15
1.5. Propriedades do mel.....	17
1.5.1. Propriedades bioativas	17
1.5.2. Propriedades sensoriais.....	17
1.6. Objetivos	19
Capítulo II: Materiais e Métodos.....	21
2.1. Amostras de mel.....	23

2.1.1. Características dos méis sem aromatização	23
2.1.2. Características dos méis com aromatização.....	24
2.2. Análise de parâmetros físico-químicos	24
2.2.1. Medição do pH.....	24
2.2.2. Atividade da água	25
2.3. Determinação da atividade antioxidante	25
2.4. Análise polínica.....	26
2.5. Análise dos compostos voláteis.....	26
2.5.1. Micro-extração em fase sólida em espaço de cabeça (HS-SPME).....	26
2.5.2. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo (GC-qMS).....	27
2.6. Análise estatística.....	28
Capítulo III: Resultados e Discussão.....	30
3.1. Análise de características e propriedades dos méis com e sem aromatização	32
3.1.1. pH.....	32
3.1.2. Atividade da água	34
3.1.3. Atividade antioxidante	35
3.2. Análise polínica.....	38
3.3. Análise dos compostos voláteis.....	41
3.3.1. Compostos voláteis dos méis sem aromatização	41
3.3.1.1. Relação dos compostos voláteis com a origem floral do mel.....	47
3.3.2. Compostos voláteis dos méis com aromatização.....	48
Capítulo IV: Conclusões.....	56
Capítulo V: Referências Bibliográficas	61
Capítulo VI: Anexos.....	75

Índice de Figuras

Figura 1 - Distritos de aquisição do mel cru (Aveiro e Vila Real).....	4
Figura 2 - Abelha a transportar os grãos de pólen nas corbículas (Fonte: https://www.bee-america.com consultado 29/04/17).....	5
Figura 3 - Interação dos compostos voláteis com o sistema olfativo humano (44).....	11
Figura 4 - Estrutura do isopreno.....	13
Figura 5 - Biossíntese dos compostos terpênicos nas plantas (61,62).....	14
Figura 6 - Exemplos de compostos já identificados no mel.....	15
Figura 7- Degradação dos carotenóides conduzindo à formação de norisoprenóides em C ₉ , C ₁₀ , C ₁₁ e C ₁₃ (67).....	15
Figura 8 - Exemplos de norisoprenóides megastigmanos (67).	16
Figura 9 - Exemplos de norisoprenóides não-megastigmanos (67).	16
Figura 10 - Sistema de micro-extração em fase sólida (SPME) em modo espaço de cabeça (fase estacionária introduzida na fase de vapor da amostra) (44).....	27
Figura 11 - Comparação dos valores de pH dos méis com aromatização em relação ao mel base.	33
Figura 12 - Comparação dos valores da atividade da água dos méis com aromatização em relação ao mel base. Resultados expressos em média±erro. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0,0001.....	35
Figura 13 - Comparação dos valores da atividade antioxidante dos méis com aromatização em relação ao mel base. Resultados expressos em média±erro. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.....	36
Figura 14 - Famílias de compostos voláteis identificadas nos méis sem aromatização. Resultados expressos em valor médio de área cromatográfica±erro e comparados com o mel base *p<0.05, **p<0.01.....	42
Figura 15 - Famílias de compostos voláteis identificadas nos méis com aromatização. Resultados expressos em valor médio de área cromatográfica±erro.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição do mel; valores (g/100g) (14).	8
Tabela 2 - Exemplos de descritores de aromas de alguns compostos voláteis identificados em mel.	18
Tabela 3 - Características dos três méis sem aromatização.	23
Tabela 4 - Características dos seis méis com aromatização.	24
Tabela 5 - Valores médios do pH das amostras de mel sem aromatização.	32
Tabela 6 - Valores médios da atividade da água das amostras de mel analisadas.	34
Tabela 7 - Resultados da atividade antioxidante das amostras de mel sem aromatização.	36
Tabela 8 - Predominância de pólenes no mel de Oliveira de Azeméis (mel de inverno).	38
Tabela 9 - Predominância de pólenes no mel de Oliveira de Azeméis (mel de verão).	39
Tabela 10 - Predominância de pólenes no mel de Vila Real (mel base).	40
Tabela 11 - Compostos voláteis identificados por HS-SPME/GC-qMS nos três méis sem aromatização.	45
Tabela 12 - Compostos voláteis identificados por HS-SPME/GC-qMS nos seis méis com aromatização.	52

Lista de abreviaturas

% -Percentagem

a_w - atividade da água

CV- coeficiente de variação

DMAPP- dimetilalilpirofosfato

DVB/CAR/PDMS- divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano

FPP- farnesilpirofosfato

GC-qMS cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo

GPP- geranilpirofosfato

GGPP- geranilgeranilpirofosfato

HMF- hidroximetilfurfural

HS-SPME- *Headspace-Solid-Phase Microextraction* (microextração em fase sólida em espaço de cabeça)

I- percentagem de inibição

IPP- isopentenilpirofosfato

PDMS- polidimetilsiloxano

PPB- partes por bilhão

RPM- rotações por minuto

TDN- 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidro-naftaleno

Capítulo I: Introdução Teórica

1. Introdução Teórica

1.1. Enquadramento geral

O mel é um alimento natural bastante valorizado e utilizado desde os primórdios da humanidade devido à sua doçura e valor nutritivo (1,2). Antes do desenvolvimento dos métodos de refinação do açúcar, o mel era o único adoçante disponível, representando uma fonte importante de hidratos de carbono (3).

Nos últimos anos, devido à melhoria dos padrões de vida e ao interesse crescente por produtos naturais com efeitos benéficos para a saúde, tem-se verificado um aumento do seu consumo e da investigação das suas características e propriedades (4). O perfil de aroma é uma das propriedades essenciais de um produto alimentar, tanto pelas características organoléticas, como pela sua autenticidade (5).

Os açúcares e a água representam os principais constituintes do mel, sendo os compostos voláteis uma parte minoritária. Apesar disso, estes últimos influenciam as propriedades organoléticas do mel (6), sendo os principais responsáveis pelo aroma e, em conjunto com outros fatores, pelo sabor. Devido ao grande número de compostos voláteis existentes, o perfil de aroma representa a identidade do produto, podendo ser usado na determinação da origem do mel (7). Alguns compostos estão presentes no néctar ou na melada e relacionados com as características da planta. Outros compostos são originados durante o processamento ou armazenamento do mel (8).

Existem várias técnicas já utilizadas para o estudo dos compostos voláteis do mel, sendo a microextração em fase sólida em espaço de cabeça e cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massa com quadrupolo (HS-SPME/GC-qMS) uma delas. Outra metodologia bastante utilizada na caracterização do mel é a análise polínica, permitindo classificar e indicar a origem floral, sendo estes aspetos importantes, visto que um mel monofloral apresenta um maior valor comercial. Assim, a análise dos compostos voláteis, associada à análise polínica e a análises físico-químicas como o pH, a atividade da água, como também a atividade antioxidante, surgem como uma ferramenta útil na caracterização de méis (9).

1.2. Empresa - More than Honey, Lda

A empresa More than Honey, Lda e a marca Beesweet foram criadas no ano de 2014, em Oliveira de Azeméis, no distrito de Aveiro. A sua atividade consiste na compra de mel cru (figura 1), realizando, posteriormente, as aromatizações do mesmo, vendendo o produto final a nível nacional e internacional.



Figura 1 - Distritos de aquisição do mel cru (Aveiro e Vila Real).

A Beesweet apresenta seis méis com diferentes aromatizações: limão (N.º 1 Citrus), menta (N.º 5 Winter), salgado (N.º 10 Seasalt), canela (N.º 25 Christmas), chocolate (N.º 66 Beelove) e picante (N.º 88 Fire). Vende, ainda, um mel proveniente de uma floração de mirtilo, favos de mel e bombons de chocolate negro recheados com mel aromatizado.

1.3. Mel

1.3.1. Definição

O mel é um alimento nutritivo, com relevância económica, sendo o produto primário produzido pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* (10). É, sobretudo, uma solução natural açucarada, consumida em larga escala no mundo inteiro e desempenha um papel importante na dieta humana, sendo também utilizado nas indústrias alimentar, farmacêutica e de cosmética (11).

1.3.2. Produção

A transformação de néctar em mel inicia-se ao nível das corbículas (cestos de pólen), local para onde é recolhido, pelas abelhas, o pólen, néctar ou melaço (12). Depois de pousar em várias flores, as abelhas recolhem os grãos de pólen acumulados no seu corpo, transferindo-o para as corbículas, com o auxílio das patas traseiras e intermédias (figura 2). Posteriormente, transportam o conteúdo para a colmeia e essa mistura é depositada nos alvéolos dos favos de mel pelas abelhas operárias (13).



Figura 2 - Abelha a transportar os grãos de pólen nas corbículas (Fonte: <https://www.bee-america.com>, consultada em 29/04/2017).

A transformação do néctar em mel continua ao nível dos alvéolos dos favos, apresentando várias etapas: evaporação da água presente no néctar; aumento do conteúdo de açúcar invertido devido à hidrólise da sacarose em frutose e glucose; incorporação de proteínas provenientes das plantas e das glândulas salivares das abelhas, de compostos de

aroma, minerais e vitaminas (14). Esta transformação ocorre entre um a três dias e, quando o teor de humidade é inferior a 20%, as abelhas fecham os alveólos com cera, prevenindo assim a absorção de água pelo mel (14). Assim, o processo de amadurecimento do mel continua com a síntese de novos açúcares e com a contínua hidrólise da sacarose pela enzima invertase. Na produção e no processamento é essencial preservar a composição do mel, particularmente os compostos voláteis (14).

1.3.3. Classificação

O mel, tendo em conta a sua produção e origem botânica e geográfica, apresenta diferentes designações. No que concerne ao modo de produção ou apresentação, pode ser classificado de mel em favos ou com pedaços de favos, mel escorrido, centrifugado, prensado e filtrado. No que diz respeito à origem, pode adquirir a designação de mel de néctar/flores ou mel de melada. O mel de néctar/flores é obtido a partir do néctar de plantas e o mel de melada é obtido principalmente das secreções provenientes das plantas ou de excreções de insetos sugadores que ficam sobre as partes vivas destas (10).

O mel pode ser classificado como monofloral ou multifloral. O primeiro é proveniente principalmente de flores da mesma família, género ou espécie e com características sensoriais e físico-químicas próprias; o segundo é proveniente de origens florais diferentes. A designação de monofloral é utilizada na descrição de méis obtidos a partir de pólen de uma espécie de planta em percentagem superior a 45%, com algumas exceções como, por exemplo, o mel de rosmaninho (pelo menos 10%) e de castanheiro (90%) (15,16). A obtenção de méis monoflorais depende de fatores tais como as condições climáticas da região, as variações de temperatura e as técnicas adotadas pelo apicultor (7).

A análise polínica ou melissopalínologia é uma metodologia utilizada para o controlo de qualidade alimentar, sendo fundamental na classificação e emissão de certificados de origem botânica e/ou geográfica do mel. Além de permitir definir a origem, também permite detetar adulterações (15). A origem floral e geográfica constituem aspetos importantes da qualidade do mel, influenciando significativamente o seu valor comercial (16).

Existem dois tipos de análise polínica: qualitativa e quantitativa (17). Na análise qualitativa são indicadas as proporções em que se encontram os diferentes tipos de grãos de pólen no mel, sabendo assim a origem geográfica e botânica. A análise polínica quantitativa, para além de indicar o número absoluto de cada tipo de grãos de pólen presentes no mel, permite ainda conhecer outras partículas (por exemplo, melada ou detritos) e deduzir o método usado na extração (por exemplo, centrifugação ou prensagem) (17,18). Os grãos de pólen podem ter várias dimensões e cores, entre o branco, amarelo, laranja, vermelho e os tons mais escuros, dependendo da sua origem botânica e da composição química dos pigmentos encontrados na exina (camada externa do grão de pólen) (13).

1.3.4. Aromatização

A aromatização é uma metodologia que consiste, maioritariamente, na adição de especiarias ou plantas aromáticas (ou partes destas) a diferentes tipos de alimentos. (19,20).

Uma das técnicas usadas para induzir a migração dos compostos de interesse das plantas aromáticas ou das especiarias é o método de infusão. Como ocorrem alterações das propriedades sensoriais e de determinadas características físico-químicas é necessário ter em atenção o tempo de infusão e a concentração das plantas usadas, de modo a evitar uma aromatização excessiva (20,21). Apresenta a desvantagem de também poder ocorrer a migração de compostos indesejáveis, o que pode afetar a validade e estabilidade do alimento (20).

1.4. Composição

Na composição do mel (tabela 1) destacam-se, maioritariamente, os hidratos de carbono (frutose e glucose) (22). Apresenta também pequenas quantidades de outras substâncias, tais como minerais, proteínas, vitaminas, ácidos fenólicos e flavonóides, enzimas e outras substâncias (23). O mel de melada, em comparação com o de néctar, apresenta uma maior quantidade de ácidos orgânicos e menor de frutose e glucose.

A composição do mel e as suas propriedades estão associadas à origem botânica e à área geográfica de onde é originário, uma vez que o solo e o clima influenciam a flora (24).

Tabela 1 - Composição do mel de néctar e de melada; valores (g/100g) (14,25).

Constituintes	Mel de Néctar		Mel de Melada	
	Média	Min-Máx	Média	Min-Máx
Água	17,2	13,4 – 22,9	16,3	12,2 – 18,2
Frutose	38,2	27,3 – 44,3	31,8	23,9 – 38,1
Glucose	31,3	22,0 – 40,8	26,1	19,2 – 31,9
Sacarose	2,4	1,7 – 3,0	0,8	0,44 – 1,14
Dissacarídeos redutores	7,3	2,7 – 16,0	8,80	5,1–12,5
Outros oligossacarídeos	3,1	0 – 13,2	4,70	1,3 –11,5
Nitrogénio	0,06	0,05 – 0,08	0,10	0,05–0,22
Minerais	0,22	0,20 – 0,24	0,74	0,21 – 1,18
Ácidos Livres ^a	22,0	6,8 – 47,2	49,1	30,3–66,0
Ácidos Totais ^a	29,1	8,7 – 59,5	54,9	34,6 – 76,5

^amEq de ácido glucónico/kg

1.4.1. Hidratos de carbono

Os açúcares são os constituintes maioritários do mel e correspondem a cerca de 95 a 99% da matéria seca (26), sendo essencialmente frutose (38,2%) e glucose (31,3%) (27). Os restantes constituem cerca de 12% (19) e incluem dissacarídeos, como maltose e isomaltose, trissacarídeos e tetrassacarídeos. A proporção de frutose em relação à glucose depende bastante da fonte de néctar (7). Geralmente, a fração de frutose é maioritária em comparação com a glucose (29).

1.4.2. Água

A água é o segundo componente mais importante do mel. A sua quantidade depende de vários fatores, tais como: época de colheita; grau de maturação alcançado na colmeia; fatores climáticos; tratamento do mel durante a extração e armazenamento (30). Pode influenciar a viscosidade, a maturação, a cristalização, o sabor, a conservação e o valor comercial do mel (26,31).

A atividade da água do mel apresenta valores entre 0,5 e 0,65 (32) e, de acordo com a legislação Portuguesa (10), o limite máximo de água presente é de 20% para o mel em geral e 23% para o mel floral puro. Um conteúdo excessivo dificulta a conservação e armazenamento do mel (26). O teor máximo de água presente é o único critério de composição a ser cumprido por todos os méis do comércio mundial (33).

1.4.3. Proteínas

Relativamente às proteínas, o mel apresenta na sua constituição uma pequena quantidade (aproximadamente 0,5%). Estas são provenientes de duas origens, a vegetal, procedente do néctar e do pólen, e a animal, proveniente das secreções das glândulas salivares das abelhas (34).

1.4.3.1. Enzimas

As enzimas estão naturalmente presentes no mel e contribuem para a formação deste a partir do néctar e da melada. As principais são a invertase (sacarase), a glucose oxidase (segregada pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas) e a diastase (α -amilase) (35).

A enzima invertase atua sobre a sacarose da seiva, hidrolisando-a em glucose e frutose. A glucose oxidase, na presença de água e oxigénio, é a responsável pela conversão da glucose em ácido glucónico e peróxido de hidrogénio. Estes contribuem para as propriedades antimicrobianas, preservando e mantendo a esterilidade do mel durante a maturação (35). A diastase tem como função digerir a molécula de amido, podendo também estar envolvida na digestão do pólen proveniente das plantas, apresentando o pólen na sua composição frutose, glucose, sacarose, proteínas, lípidos, entre outros componentes (36,37).

1.4.3.2. Aminoácidos

O aminoácido presente em maior quantidade é a prolina, sendo adicionado pelas abelhas aquando do início da conversão do néctar em mel. O perfil de aminoácidos de um mel pode ser característico da sua origem botânica, uma vez que a principal fonte é o pólen (38).

1.4.4. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos constituem cerca de 0,57% do mel e é devido a isso que este apresenta uma leve acidez (39) fazendo com que o seu pH varie entre 3,4 e 6,1, sendo o valor médio de 3,9 (14). Os ácidos orgânicos estão relacionados com a cor e sabor do mel e ainda com propriedades físicas e químicas, como o pH, acidez e condutividade elétrica (40,41). O ácido predominante no mel é o ácido glucónico. A sua presença deve-se à glucose oxidase que as abelhas adicionam ao mel durante a maturação (39).

1.4.5. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos caracterizam-se por apresentarem pelo menos um anel aromático, contendo um ou mais grupos hidroxilo no anel (42). Podem ser divididos, de acordo com a sua estrutura química, nas classes: não-flavonóides (ácido fenólico) e flavonóides (43). Os ácidos fenólicos do mel estão divididos em ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidrocínâmicos, enquanto os flavonóides podem dividir-se em flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (42,44).

Os ácidos fenólicos constituem uma classe importante de compostos fenólicos com funções bioativas, sendo metabolitos secundários necessários às plantas. São compostos que atuam como antioxidantes, eliminando os radicais livres e inibindo a oxidação lipídica (42). Os flavonóides representam mais de 50% de todos os compostos fenólicos naturais. Quando as abelhas recolhem o néctar, vários derivados polifenólicos podem ser transferidos das plantas para o mel (45). São os principais compostos bioativos que podem

contribuir significativamente para a atividade antioxidante total, trazendo efeitos benéficos para a saúde humana (46).

1.4.6. Compostos voláteis

1.4.6.1. Origem

Os compostos voláteis presentes no mel podem ter origem em constituintes da planta ou da transformação desses constituintes pela abelha, mas também em processos térmicos ou armazenamento prolongado (47).

As plantas produzem vários tipos de metabolitos secundários, muitos dos quais investigados devido aos seus efeitos benéficos em diversas funções biológicas. Muitos compostos voláteis são produzidos nos tecidos das plantas em diferentes estados de desenvolvimento como, por exemplo, durante a floração, amadurecimento ou maturação. Alguns compostos voláteis são comuns a várias espécies de plantas, enquanto outros são específicos de uma determinada espécie (48).

1.4.6.2. Relação dos compostos voláteis com o aroma

Os compostos voláteis são substâncias de aroma perceptíveis pelo sistema olfativo humano (figura 3) (49). Contribuem para a definição do aroma e sabor característico do mel, embora nem todos apresentem sempre um impacto significativo (14).

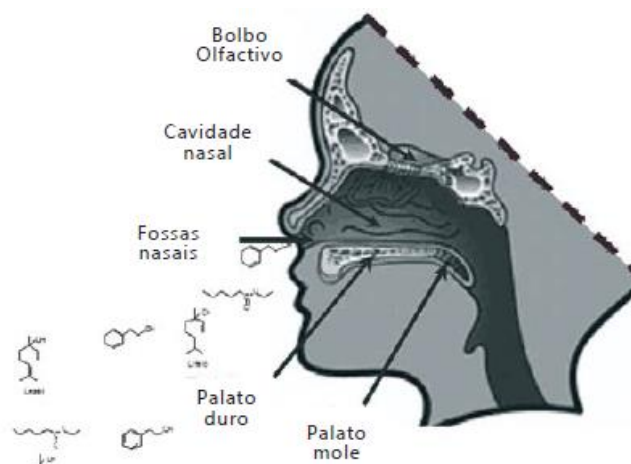


Figura 3 - Interação dos compostos voláteis com o sistema olfativo humano (49).

O aroma traduz a sensação obtida pelo cérebro quando o epitélio olfativo recebe uma fração de moléculas que se vaporizou (via nasal direta) ou em contacto com a boca (via retronasal) (50). A intensidade de uma sensação olfativa não depende apenas da concentração desse componente, mas também da sua volatilidade e do limiar de percepção sensorial (50).

Denomina-se limiar de percepção sensorial a concentração mínima em que um composto de aroma é detetado por, pelo menos, 50% dos provadores num júri. A percepção sensorial destes compostos varia bastante, dependendo do tipo e concentração. Determinados compostos presentes em quantidades vestigiais podem contribuir mais para o aroma do que outros compostos presentes em maior quantidade (50,51).

A presença dos compostos voláteis pode fornecer informações acerca da origem botânica do mel e se este foi produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores ou de exsudados segregados pelas plantas ou insetos (52). Os méis monoflorais possuem perfis de aroma mais individuais comparativamente com méis multiflorais, devido à presença de compostos voláteis específicos, decorrentes das fontes de néctar de origem (53).

1.4.6.3. Compostos voláteis presentes no mel

O aroma e o sabor do mel são devidos, fundamentalmente, a componentes de baixo peso molecular provenientes das plantas. Já foram identificados cerca de 600 compostos voláteis (38) sendo pertencentes, em geral, a monoterpenóides, norisoprenóides, sesquiterpenóides e, em menor teor, álcoois, ésteres, ácidos gordos, cetonas e aldeídos (54).

1.4.6.3.1. Compostos terpénicos

Os compostos terpénicos são polímeros de isopreno e podem ser categorizados com base no número de unidades de isopreno (figura 4) (4). Constituem uma das mais diversas famílias de produtos naturais, com mais de 40000 estruturas diferentes de terpenos descobertos (55,56).

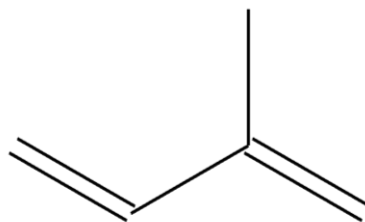


Figura 4 - Estrutura do isopreno.

Os compostos terpênicos são os principais constituintes dos compostos voláteis das plantas e dos óleos essenciais, estando presentes em vários tipos de méis (57). O grau de volatilidade destes compostos depende da sua estrutura (por exemplo, oxigenação ou saturação das ligações duplas) (58). Tendo em conta a estrutura podem ser classificados em terpenos, terpenóis, óxidos de terpenos, etc, denominando-se de forma genérica de terpenóides. Os terpenos apresentam na sua constituição apenas carbono e hidrogénio. Os terpenóides, além de carbono e hidrogénio, possuem na sua estrutura oxigénio, organizados em diferentes grupos funcionais (álcool, ácido carboxílico, éter, aldeído e cetona, entre outros) (59). Nas plantas, os compostos terpênicos são essenciais aos processos celulares básicos e a mecanismos de defesa. Os terpenóides têm ainda funções específicas como, por exemplo, a atração de insetos polinizadores aos tecidos florais (60,61).

Todos os terpenóides são formados pela condensação de várias moléculas com 5 átomos de carbono, o isopentenilpirofosfato (IPP), derivado do isopreno C₅ (62). As moléculas formadas por duas unidades, ou seja, 10 átomos de carbono, são denominadas monoterpenóides, com 15, sesquiterpenóides, com 20, diterpenóides, com 25, sesterpenóides, com 30, triterpenóides e com 40, tetraterpenóides.

O IPP pode ser sintetizado por duas vias distintas: a do ácido mevalónico e a do piruvato/gliceraldeído-3-fosfato (60,63). Na primeira ocorre a condensação sequencial de três moléculas de acetil-CoA para gerar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, sendo depois convertido em ácido mevalónico, numa reação irreversível (64). Posteriormente, o ácido mevalónico é sequencialmente fosforilado e descarboxilado para gerar o IPP.

A segunda via estabelece que o IPP é sintetizado a partir do ácido pirúvico (47). Na segunda etapa, o IPP é isomerizado a dimetilalilpirofosfato (DMAPP). Esta última molécula é considerada a unidade de partida para a síntese dos terpenóides, sendo o IPP a unidade repetitiva. Assim, através de uma série de reações de condensação destas duas unidades em C₅, são sintetizados o geranylpirofosfato (GPP), o farnesilpirofosfato (FPP) e

o geranylgeranilpirofosfato (GGPP) (figura 5). Posteriormente, o GPP dá origem aos monoterpenos, o FPP aos sesquiterpenos e o GGPP aos diterpenos. Os monoterpenos derivados do GPP são os mais encontrados nos méis (48,49).

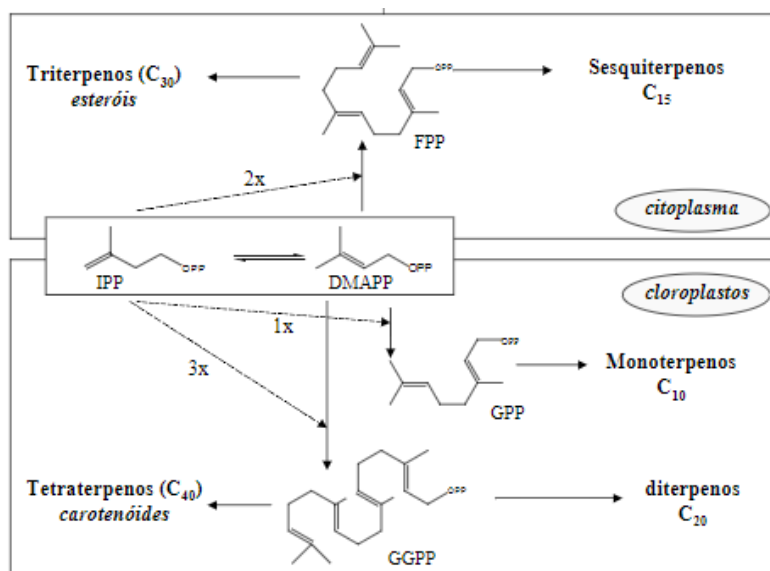


Figura 5 - Biossíntese dos compostos terpênicos nas plantas (65,66).

Assim, ao nível do citoplasma ocorre a síntese dos esteróis e dos sesquiterpenóides, enquanto que nos cloroplastos ocorre a síntese do isopreno, carotenóides, monoterpenos e diterpenos (60). Os terpenóides superiores são formados a partir do geranylpirofosfato, por condensação de moléculas de isopentenilpirofosfato (sesterpenos) ou por condensação de moléculas iguais (farnesilpirofosfato e geranylgeranilpirofosfato), que originam os triterpenos e tetraterpenos respetivamente (65).

As estruturas IPP e DMAPP podem dar origem a uma grande variedade de compostos. Alguns exemplos de compostos já identificados no mel (figura 6) são o linalol, β -terpineol, α -terpineol, β -citronelol, β -pineno, cânfora, cavacrol, 1,8-cineol, limoneno, entre outros (41,42). São vários os terpenos conhecidos por apresentarem propriedades benéficas (antimicrobianos e antioxidantes) (4). O linalol é um dos compostos mais frequentemente encontrado no mel, sendo proveniente do néctar das plantas (67).

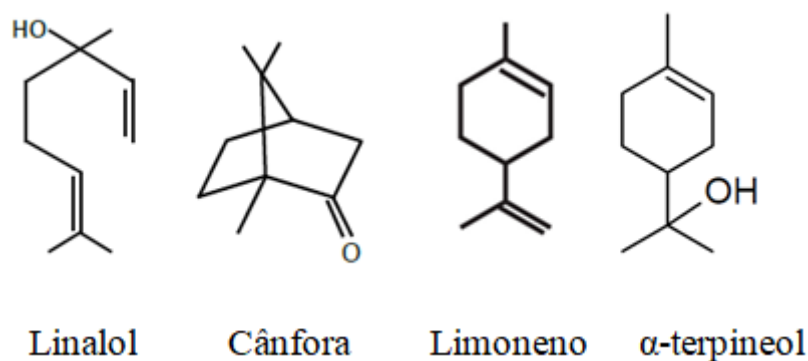


Figura 6 - Exemplos de compostos monoterpênicos identificados no mel.

1.4.6.3.2. Norisoprenóides

Os norisoprenóides são compostos derivados da degradação dos carotenóides, sendo estes tetraterpenos, isto é, compostos C_{40} formados por 8 unidades C_5 . Os carotenóides sofrem reações, formando os norisoprenóides. Esses mecanismos envolvem dois tipos de reações: enzimática, catalisada por dioxigenases; não enzimática envolvendo uma ou várias etapas de degradação dos carotenóides, estimuladas por fatores externos como a luz, oxigênio, temperatura e hidrólise ácida (68,69). Os produtos de degradação dos carotenóides são compostos carbonilo com 9, 10, 11 ou 13 átomos de carbono, mantendo o grupo terminal do carotenóide (figura 7). Os compostos de C_{13} são os norisoprenóides mais abundantes na natureza (70) e apresentam um baixo nível de percepção sensorial (ppb), originando odores agradáveis, tais como florais, frutados, eucalipto e cânfora (71).

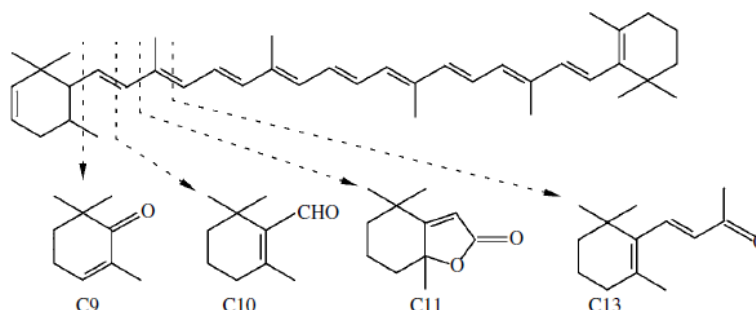


Figura 7- Degradação dos carotenóides conduzindo à formação de norisoprenóides em C_9 , C_{10} , C_{11} e C_{13} (71).

Os norisoprenóides em C₁₃ estão divididos em dois grupos: os megastigmanos e os não-megastigmanos. A estrutura do megastigmano é caracterizada por um anel ciclohexano substituído nos carbonos 1, 5 e 6, e uma cadeia alifática insaturada com 4 átomos de carbono ligada a C₆. Esta estrutura pode ser oxigenada no carbono 7, como na β-damascenona, ou no carbono 9, como na β-ionona (figura 8). A β-damascenona encontra-se associada ao aroma característico do mel e a β-ionona a violetas (71).

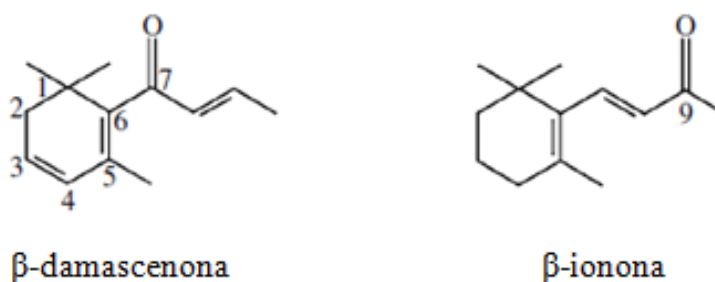


Figura 8 - Exemplos de norisoprenóides megastigmanos (71).

Também são mencionados frequentemente alguns norisoprenóides não-megastigmanos odoríferos (figura 9). O mais importante é o TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno) com odor medicinal. Muitos dos não-megastigmanos derivam dos megastigmanos por reações químicas em meio ácido (72).

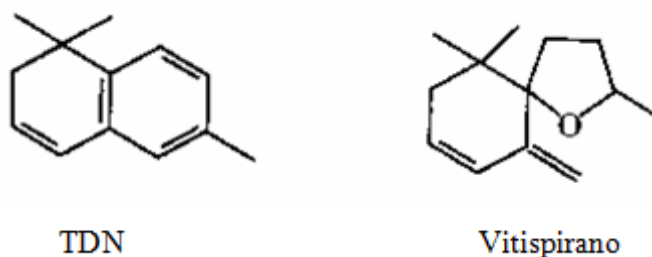


Figura 9 - Exemplos de norisoprenóides não-megastigmanos (71).

Estas moléculas apresentam um impacto sensorial importante no aroma do mel (67). A presença destes compostos é um indicador positivo dos seus precursores, carotenóides, que são associados a mecanismos de prevenção oxidativa. A β-damascenona, β-ionona, 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidro-naftaleno (TDN) e geranyl acetona são exemplos de norisoprenóides identificados nos méis (68,73).

1.5. Propriedades do mel

1.5.1. Propriedades bioativas

Nos últimos anos, têm aumentado as evidências relativamente aos benefícios do consumo de mel ao nível da saúde humana devido, principalmente, às suas propriedades bioativas. A atividade antioxidante deste, conferida pelos polifenóis e flavonoides, é a que mais se tem destacado, dados os inúmeros benefícios para a saúde que lhe são conhecidos. (28,74).

O perfil de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do mel dependem de vários fatores, nomeadamente da origem do néctar e de fatores ambientais e sazonais, variando a sua quantidade com a origem floral e geográfica (75). Têm sido publicados diversos estudos sobre a avaliação da atividade antioxidante do mel (76), a qual está correlacionada positivamente com o conteúdo em compostos fenólicos e consequentemente com a sua origem botânica. Verificou-se uma forte correlação entre a atividade antioxidante e a cor do mel; os méis de cor escura apresentavam um maior teor em compostos fenólicos e, consequentemente, uma atividade antioxidante mais elevada (76).

A avaliação da atividade antioxidante no mel pode contribuir para a sua valorização económica, favorecendo o respetivo uso como conservante alimentar e como alternativa de adoçante mais saudável (77).

1.5.2. Propriedades sensoriais

As propriedades sensoriais do mel como a cor, aroma e sabor encontram-se entre os principais parâmetros na determinação da sua qualidade (78). Estes atributos estão interligados e dependem das substâncias voláteis relacionadas com o aroma original das flores, onde o néctar foi recolhido. O aroma e sabor estão interligados diretamente com a cor do mel e dependem maioritariamente da sua origem floral (78). Outros fatores como a fisiologia da abelha, as condições climáticas (temperatura e humidade) e o processamento após colheita apresentam uma menor influência nas propriedades do mel (79).

A cor do mel é um dos critérios usados na identificação da origem botânica, podendo variar desde tons de âmbar até tons muito escuros (preto) (40). Além da origem botânica, a

cor está relacionada com os metabolitos secundários e depende de fatores como, teor de minerais, temperatura, tempo de armazenamento e presença de pigmentos antioxidantes (80).

O aroma constitui um dos aspectos mais importantes num produto alimentar, tanto para a sua qualidade organoléptica como para a sua autenticidade (5). Pode ser definido como um conjunto de sensações olfativas e gustativas que o alimento transmite através do olfato, resultante dos diferentes compostos voláteis emitidos por este (tabela 2). Podem ser identificados nos méis vários tipos de aromas, tais como floral, doce, amadeirado, frutado, fresco, entre outros (15).

Tabela 2 - Exemplos de descritores de aromas de alguns compostos voláteis identificados em mel.

Compostos Voláteis	Descritor de Aroma	Referências Bibliográficas
Octanal	Cítrico, Verde	Bayraktar and Onoğur (2011) (81)
Nonanal	Cítrico, Floral	
Decanal	Picante, Verde, Coentros, Casca de laranja	
Nonanol	Fresco, Doce	
Linalol	Fresco, Floral	Shimoda <i>et al.</i> (1996) (82)
Benzaldeído	Doce, Amêndoa	
α -terpineol	Verde, Floral	
Hotrienol	Fresco, Frutado, Floral	Castro-Várquez <i>et al.</i> (2009) (54)
β -Damascenona	Frutado, Mel, Doce,	Castro-Várquez <i>et al.</i> (2006) (83)
Fenilacetaldéido	Mel	

No que diz respeito ao sabor, os parâmetros observados são doce, amargo, ácido e salgado. O sabor doce está relacionado com a razão frutose/glucose, o amargo com a presença de sais minerais e compostos fenólicos, o ácido com os compostos que influenciam o pH (nomeadamente o ácido glucónico) e o salgado com a quantidade de sais minerais presentes (15).

1.6. Objetivos

Este trabalho visou contribuir para o aumento do conhecimento científico dos méis com e sem aromatização, da marca Beesweet, nomeadamente em termos da composição polínica, de compostos voláteis e da capacidade antioxidante.

Teve como principais objetivos:

- Caracterizar os perfis voláteis de méis sem aromatização e de méis aromatizados (limão, chocolate, flor de sal e alga, menta, canela e picante);
- Relacionar a análise polínica com os compostos voláteis presentes nos méis com diferentes origens florais e geográficas;
- Avaliar a atividade antioxidante dos méis.

Para a concretização destes objetivos foi realizada uma análise polínica e a composição volátil dos méis foi caracterizada usando a técnica de micro-extração em fase sólida em espaço de cabeça acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo (HS-SPME/GC-qMS). A atividade antioxidante dos méis foi determinada espectralmente, utilizando o método de ABTS.

Capítulo II: Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras de mel

No presente trabalho foram utilizadas nove amostras de mel: três de mel sem aromatização (mel base, verão e inverno) e seis de mel aromatizado. Os seis méis com diferentes aromatizações são: limão (N.º 1 Citrus), menta (N.º 5 Winter), salgado (N.º 10 Seasalt), canela (N.º 25 Christmas), chocolate (N.º 66 Beelove) e picante (N.º 88 Fire). As amostras de mel foram armazenadas à temperatura ambiente e fornecidas pela empresa More than Honey, Lda.

2.1.1. Características dos méis sem aromatização

As amostras de mel, sem aromatização, são provenientes de dois apiários diferentes, um deles localizado em Nogueira do Cravo, Oliveira de Azeméis e o outro na zona de Vila Real, sendo este último a base dos méis com aromatização (tabela 3). As duas amostras de mel procedentes de Oliveira de Azeméis apresentam tempo de recolha e de maturação diferentes e, tendo isso em consideração, um é denominado mel de verão e o outro de inverno. Segundo os apicultores, a flora predominante no apiário de Oliveira de Azeméis são eucaliptos (*Eucalytus spp*), castanheiros (*Castanea sativa*), silvas (*Rubus spp*), urzes (*Erica spp*), salgueiros (*Salix spp*), carvalhos (*Quercus robur*) e plantas ribeirinhas. No apiário de Vila Real o que predomina são estevas (*Cistus ladanifer*), giestas (*Cytisus spp*), urzes (*Erica spp*), azinheiras (*Quercus ilex*), sobreiros (*Quercus suber*), castanheiros (*Castanea sativa*), lavanda (*Lavandula*) e medronheiros (*Arbutus unedo*).

Tabela 3 - Características dos três méis sem aromatização.

Amostra	Origem geográfica	Ano de produção	Tempo de Maturação	Cor
Mel Base	Vila Real	2016	2 meses (maio a julho de 2016)	Âmbar
Mel Verão	Oliveira de Azeméis		4 meses (março a julho de 2016)	Dourado
Mel Inverno			8 meses (julho de 2015 a março de 2016)	Âmbar escuro

2.1.2. Características dos méis com aromatização

As amostras de mel de limão (N.º 1 Citrus), de menta (N.º 5 Winter), picante (N.º 88 Fire) e de canela (N.º 25 Christmas) são aromatizados com plantas aromáticas frescas; o de chocolate (N.º 66 Beelove) é adicionado com cacau magro em pó da marca Cimarrom (10 a 12% de manteiga de cacau) e o salgado (N.º 10 Seasalt) tem 3% de flor de sal de Aveiro, comercializada pela empresa SalTalQual, Lda e 1% de flocos de macroalga fava-do-mar (*Fucus vesiculosus*) biológica e desidratada, comercializada pela empresa ALGAplus, Lda.

Tabela 4 - Características dos seis méis com aromatização.

Amostra	Tipo de Aromatização	Cor	Período de armazenamento após aromatização
Chocolate	Cacau magro 100% natural.	Chocolate escuro	30 dias
Picante	Plantas Aromáticas	Dourada	60 dias
Menta	Plantas Aromáticas	Âmbar escuro	30 dias
Limão	Plantas Aromáticas	Avelã/Âmbar	60 dias
Salgado	Flor de sal e macroalgas <i>Fucus vesiculosus</i> biológica	Ouro cristalino	30 dias
Canela	Plantas Aromáticas	Ouro	30 dias

2.2. Análise de parâmetros físico-químicos

2.2.1. Medição do pH

Para determinar o pH do mel foram dissolvidos 3 gramas das amostras de mel em 30 mL de água destilada. As leituras do pH das soluções aquosas de mel (10%) foram realizadas num potenciómetro a aproximadamente 20°C. As medições foram realizadas em triplicado.

2.2.2. Atividade da água

A atividade da água foi medida num medidor de atividade da água, Novasina LabSwift- a_w , a aproximadamente 24°C. Para cada determinação, pesou-se cerca de um grama de cada mel. As medições foram realizadas em triplicado.

2.3. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos méis foi determinada espectrofotometricamente, utilizando o método de ABTS com uma placa de 96 poços e com recurso a um leitor de placas Biotek.

Preparou-se inicialmente a solução de ABTS^{•+}, adicionando-se 19,2 mg de ABTS a 5 mL de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$). Este último, por sua vez, foi preparado, adicionando 3,31 mg de ($K_2S_2O_8$) a 5 mL de água destilada. A solução de ABTS foi mantida no escuro durante 16-18 horas, a temperatura ambiente, para a formação do catião radicalar.

Para a construção da curva de calibração foram utilizadas soluções-padrão de Trolox (0-422 μ M). As soluções padrão foram obtidas através da adição de aproximadamente 10mg de Trolox a 100mL de água destilada. Posteriormente foram preparadas soluções aquosas de mel a 5%, com exceção do mel aromatizado com chocolate, que foi a 2,5%, em virtude da amostra ser menos solúvel. A 50 μ L de solução aquosa de mel (5% e 2,5%) adicionou-se 250 μ L de solução de ABTS^{•+}, previamente diluída em água destilada (1 mL da solução de ABTS^{•+} em 80 mL de água destilada). Depois de reagir no escuro, durante 15 minutos, a absorvância foi lida a 734 nm.

A percentagem de inibição é determinada pela seguinte fórmula, sendo I a percentagem de inibição do ABTS^{•+}, A_B a absorvância do branco e A_A a absorvância da amostra.

$$I = \frac{A_B - A_A}{A_B} \times 100$$

O procedimento foi realizado em triplicado e os resultados expressos em equivalentes de Trolox (μ M) por 1 g de mel.

2.4. Análise polínica

A análise polínica foi realizada no Instituto Politécnico de Bragança, baseando-se no método proposto por Louveaux *et al.* (17). A análise foi efetuada pelo método da preparação de lâminas sem acetólise. Inicialmente dissolveram-se 10 g de mel em 10 mL de H₂SO₄ a 5%. Posteriormente, as amostras foram incubadas num banho a 40°C, por 3 minutos, centrifugadas e decantadas. O precipitado foi lavado em 10 mL de água destilada, centrifugado e decantado. Desta forma, foram extraídos os grãos de pólen das amostras de mel.

Os grãos de pólen foram fixados com glicerogelatina e a análise das preparações foi realizada recorrendo ao microscópio ótico, com a ampliação de 400x e 1000x. Foram contados, no mínimo, 1000 grãos, de forma a identificar os tipos de pólen. Os tipos de pólen identificados foram comparados com as bases de referência do Centro de Investigação e Montanha (CIMO), do Instituto Politécnico de Bragança e com diferentes bases de dados de morfologia de pólen. Foram utilizados os referentes termos para a frequência de classes de pólen identificado: pólen predominante (mais de 45% de grãos contados), pólen secundário (16-45%), pólen minoritário importante (3-15%) e pólen minoritário (1-3%) (17).

2.5. Análise dos compostos voláteis

2.5.1. Micro-extração em fase sólida em espaço de cabeça (HS-SPME)

Para cada amostra (n=9) foi pesado 1,0 g de mel e *ca.* de 4,5 g de cloreto de sódio para um frasco de 60 mL, em triplicado. Posteriormente foram adicionados 21,5 mL de água destilada para diluir a amostra e diminuir a viscosidade da matriz, promovendo melhor a transferência de analitos para o espaço de cabeça.

O frasco (60 mL) foi colocado num banho a 60°C, durante 10 minutos, antes da introdução da seringa de SPME. De seguida, esta última foi introduzida através do septo da tampa do frasco e a fibra foi exposta no espaço de cabeça do frasco, durante 30 minutos (figura 10). O frasco foi parcialmente submerso de modo a ficar todo termostatizado. Todas as experiências foram realizadas sob agitação constante (380 rpm), usando uma barra e uma placa magnética. Posteriormente, a fibra de SPME foi retraída para dentro da

seringa, removida do frasco e inserida no injetor do cromatógrafo (GC-MS). O dispositivo de SPME utilizado foi equipado com uma fibra tripla divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm).

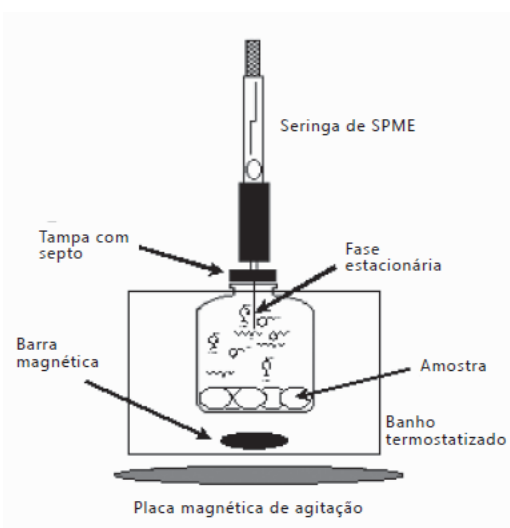


Figura 10 - Sistema de micro-extração em fase sólida (SPME) em modo espaço de cabeça (fase estacionária introduzida na fase de vapor da amostra) (49).

2.5.2. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com quadrupolo (GC-qMS)

Após a micro-extração em fase sólida, a fibra de SPME foi introduzida no injetor do GC-MS durante três minutos, para ocorrer a dessorção dos compostos voláteis. Os compostos voláteis dessorvidos foram separados por um cromatógrafo de fase gasosa Agilent Technologies 6890 N Network conectado a um detetor de massa quadrupolo Agilent 5973 N, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-FFAP com as seguintes dimensões: 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e um filme de 0,25 μm de espessura (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA). O espectrômetro de massa operou no modo impacto eletrônico a 70 eV.

Foi usado hélio como gás de arraste e o programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: temperatura inicial 40°C, com rampa de 3°C/min até 150°C, seguindo-se outra rampa de 20°C/min até 220°C em isotérmica durante 2 minutos (tempo total de 45 minutos).

Efectuou-se um branco à fibra de SPME para evitar contaminação cruzada e realizaram-se 3 réplicas para cada amostra de mel. Utilizou-se a área cromatográfica como forma de estimar o teor relativo de cada composto na amostra. A identificação dos compostos voláteis foi feita através da comparação dos espectros com os disponíveis na base de dados (Wiley 275) e outros espectros publicados (base de dados Pherobase e NIST). A cada composto identificado correspondeu uma área cromatográfica, obtida pela média das 3 réplicas efetuadas para cada amostra. A reprodutibilidade das réplicas foi expressa pelo coeficiente de variação (CV) nas tabelas e pelas barras de erro nos gráficos.

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 7. As diferenças entre as amostras foram avaliadas através do teste de t student para um nível de significância $p=0,05$. Valores de p menor ou igual a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

Capítulo III: Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise de características e propriedades dos méis com e sem aromatização

3.1.1. pH

Os valores médios de pH dos méis sem aromatização (tabela 5) variaram entre 4,18 e 4,26, estando dentro do intervalo mencionado na bibliografia, sendo o mel base o que apresentou o valor mais elevado (14). Em relação aos méis aromatizados, o pH variou entre 4,01 e 4,40.

O pH do mel é afetado pelas condições de extração e armazenamento, o que influencia a textura, estabilidade e validade (31). O crescimento de microrganismos é inibido com valores de pH mais baixos, variando os valores entre 3,4 e 6,1. O pH médio do mel é de 3,9 (14).

Tabela 5 - Valores médios do pH das amostras de mel sem aromatização.

Amostra	Base	Verão	Inverno
pH	4,26 ± 0,01	4,19 ± 0,02	4,18 ± 0,08

Os méis aromatizados de limão ($4,01 \pm 0,05$), menta ($4,09 \pm 0,03$) e picante ($4,09 \pm 0,03$) foram os que apresentaram menor valor de pH e o mel chocolate o que apresentou o valor mais alto ($4,40 \pm 0,01$). As aromatizações com recurso a plantas aromáticas, no geral, tenderam a diminuir o valor de pH. Os valores de pH obtidos nos méis com aromatização foram comparados com o mel base (figura 11). Os méis que apresentaram resultados estatisticamente significativos, em relação ao mel base, foram os aromatizados chocolate ($p=0,0004$), limão ($p=0,0070$), picante ($p=0,0069$) e menta ($p=0,0069$). As amostras mel canela ($4,24 \pm 0,02$) e salgado ($4,36 \pm 0,01$) não apresentaram resultados estatisticamente diferentes ao mel base.

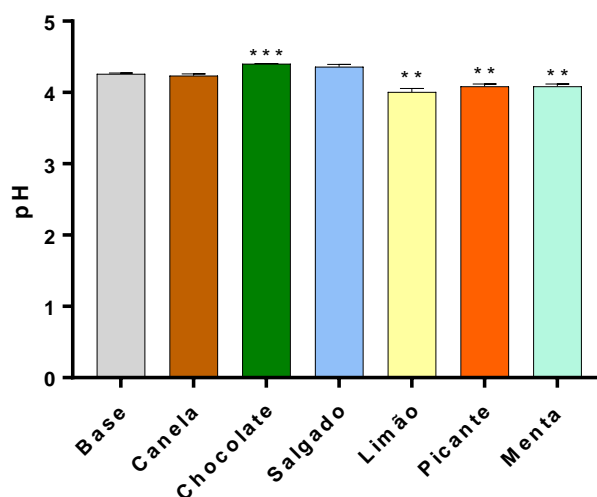


Figura 11 - Comparação dos valores de pH dos méis com aromatização em relação ao mel base.

Resultados expressos em média±erro. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

O mel apresenta um pH ácido, mas o alto teor de açúcares inibe a acidez no sabor. Devido ao teor de fosfatos, carbonatos e outros sais minerais, a adição de pequenas quantidades de bases e de ácidos não influencia o valor de pH do mel (38,40). As aromatizações das amostras em estudo não provocaram um aumento do pH para valores fora dos intervalos de referência, permitindo manter a respetiva estabilidade.

A amostra de mel com chocolate (N.º 66 Beelove) foi aromatizada com cacau em pó, apresentando este um pH de $5,6 \pm 0,3$ (anexo I- figura A I), o que pode explicar ser esta aromatização a que apresentou o pH mais elevado. Num estudo realizado com grãos de cacau, provenientes de diferentes origens geográficas, foram obtidos valores de pH entre 4,64 e 5,97 (84). A fermentação do cacau é uma etapa importante na formação da fração volátil e no desenvolvimento dos precursores de aroma, como os aminoácidos e açúcares redutores (85), sendo o pH um parâmetro importante para avaliar a extensão da fermentação. Se os grãos de chocolate apresentarem um pH elevado (5,5 a 5,8) ocorreu uma baixa fermentação, levando a que, sensorialmente, não apresentem um elevado odor a chocolate. Já um pH intermédio (5,20 a 5,49) leva a que, posteriormente, o produto apresente um maior número de descritores de aroma a chocolate (86). No entanto, o chocolate utilizado na aromatização do mel apresentava um pH elevado, inferindo uma baixa extensão da fermentação.

Nas amostras limão, picante e menta, aquando do processo de aromatização, pode ter ocorrido a migração de ácidos orgânicos dos tecidos das plantas aromáticas utilizadas, levando assim a uma diminuição do valor de pH.

3.1.2. Atividade da água

O valor da atividade da água é uma unidade proporcional ao teor de água livre presente nos alimentos. A atividade da água é um fator importante, visto que influencia a estabilidade do mel, prevenindo ou limitando o crescimento microbiano. Pode variar entre 0,5 e 0,65 (32), devido ao elevado conteúdo em frutose e glucose (27).

Méis com um valor de a_w inferior a 0,60 são estáveis em termos microbiológicos. Quanto maior for o valor de a_w , maior é o risco de ocorrer fermentação e posterior deterioração (24). Está, também, relacionada com parâmetros de qualidade como a estabilidade, viscosidade e cristalização (32,38).

Os resultados das nove amostras de méis podem ser observados na tabela 6 e na figura 12. Os valores da atividade da água dos méis sem aromatização variaram, aproximadamente, entre 0,53 e 0,56, sendo o mel verão o que apresentou o valor mais alto (tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios da atividade da água das amostras de mel analisadas.

Amostra	Base	Verão	Inverno
a_w	0,529 ± 0,0003	0,556 ± 0,0002	0,534 ± 0,0003

A comparação dos valores da atividade da água dos méis com aromatização em relação ao mel utilizado como base (figura 12) apresentou resultados estatisticamente diferentes na maioria das amostras, com exceção do mel aromatizado limão ($p=0,1161$), mostrando que apesar das aromatizações não influenciarem a estabilidade do mel em termos microbiológicos, estas aumentam significativamente o valor da atividade da água para a maioria dos méis aromatizados. As aromatizações, na sua maioria, são realizadas com plantas frescas, sendo que estas apresentam água nos seus tecidos. Durante o processo de aromatização, a água acaba por migrar dos tecidos das plantas para o mel.

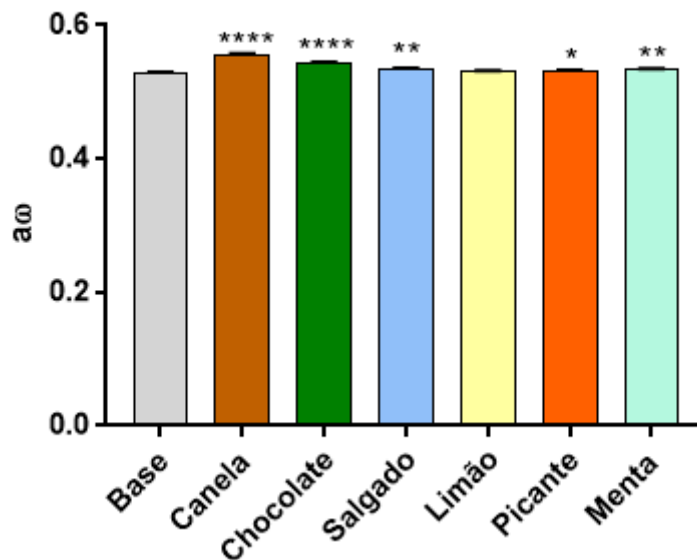


Figura 12 - Comparação dos valores da atividade da água dos méis com aromatização em relação ao mel base. Resultados expressos em média±erro. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0,0001$.

Todas as amostras se encontravam dentro do intervalo de referência da atividade da água e com valores inferiores a 0,60, não ocorrendo o risco de deterioração por microrganismos. Os resultados das amostras em análise variaram entre 0,53 e 0,56, demonstrando que as aromatizações não influenciaram a estabilidade do mel.

3.1.3. Atividade antioxidante

Comparou-se a atividade antioxidante, nomeadamente a atividade anti-radicalar, dos méis em estudo tendo como referência o padrão de Trolox. Calculou-se a atividade antioxidante total com base no método ABTS. Este método baseia-se na capacidade de reduzir o radical $ABTS^{•+}$ à sua forma neutra. Estudos realizados propõem que a atividade antioxidante do mel se deva ao teor e ao tipo de compostos fenólicos (75,76).

A atividade antioxidante dos nove méis analisados variou entre 4,83 e 8,33 μM de equivalentes de Trolox por grama de mel. Os valores obtidos são semelhantes aos encontrados na literatura, com base no mesmo método de análise, com atividades antioxidantes a variar entre 0,64 e 11,56 μM de Trolox por grama de mel (87).

Em relação aos méis sem aromatização (tabela 7) o que apresentou um maior valor de atividade antioxidante foi o mel de verão (8,33 μ M equivalentes de Trolox/grama de mel), sendo o mel de inverno o que apresentou um menor valor (6,89 μ M equivalentes de Trolox/grama de mel).

Tabela 7 - Resultados da atividade antioxidante das amostras de mel sem aromatização.

Amostras	Base	Verão	Inverno
μ M de equivalentes de Trolox/g mel	7,19 \pm 0,18	8,33 \pm 0,06	6,89 \pm 0,33

No geral, em comparação com o mel base, os valores da atividade antioxidante das aromatizações são inferiores. Os valores da atividade antioxidante dos méis com canela (6,28 \pm 0,06), salgado (4,87 \pm 0,35), picante (6,04 \pm 0,25) e menta (5,13 \pm 0,09) apresentaram resultados estatisticamente diferentes em relação ao mel base. Analisando apenas os méis aromatizados, os que apresentaram maiores valores de atividade antioxidante foram os de chocolate (7,72 \pm 0,51) e limão (6,98 \pm 0,04), não sendo estatisticamente diferentes do mel base, sendo o mel menta e o salgado os que apresentaram menor valor (estatisticamente diferentes do mel base) (figura 13).

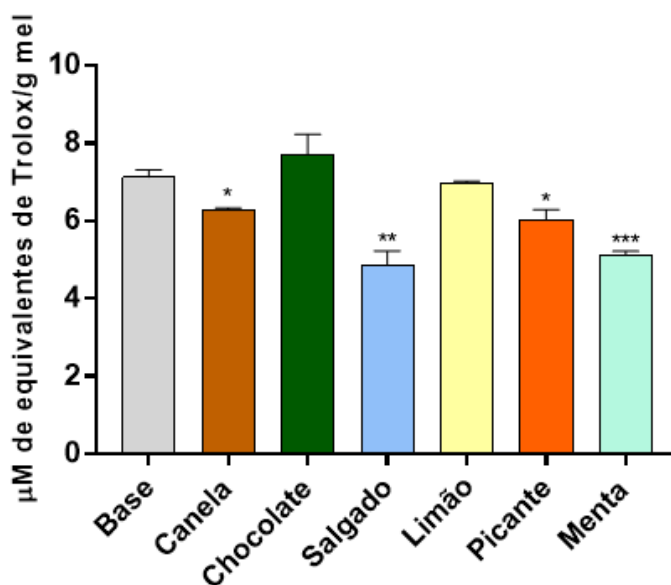


Figura 13 - Comparação dos valores da atividade antioxidante dos méis com aromatização em relação ao mel base. Resultados expressos em média \pm erro. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

As aromatizações, no geral, diminuiram a capacidade antioxidante do mel base. As mesmas não influenciaram a estabilidade do mel em termos microbiológicos, mas aumentaram significativamente o valor da atividade da água na maioria dos méis aromatizados, ocorrendo assim um aumento da percentagem de água presente. Alguns produtos utilizados nas aromatizações podem ter contribuído para uma diminuição da capacidade antioxidante, visto que durante a aromatização não migram apenas os compostos voláteis, mas também outros tipos de compostos que podem diminuir a capacidade antioxidante. Por exemplo, uma das amostras que apresentou o menor valor de atividade antioxidante foi o mel salgado (N.º 10 Seasalt), aromatizado com flor de sal de Aveiro enriquecida com flocos de macroalgas de *Fucus vesiculosus* marinhas desidratadas. Este produto apresenta na sua composição (anexo II- figura A II) diversos minerais como, por exemplo, o ferro. O ferro é um elemento que cataliza as oxidações, sendo indesejável a sua presença em diversos tipos de processamento alimentar (14).

A amostra de mel com chocolate (N.º 66 Beelove) é aromatizada com cacau em pó. Os grãos de cacau e seus derivados são fontes de polifenóis, apresentando uma capacidade antioxidante semelhante ou, em alguns casos, superior a determinados frutos e vegetais. O cacau em pó é obtido de grãos finamente moídos, sendo estes pressionados para remover a maior parte da manteiga de cacau, resultando num pó constituído por 88% a 90% de matéria não gorda e 10% a 12% de manteiga de cacau (88,89). A concentração da matéria não gorda torna o pó de cacau numa das fontes naturais mais ricas de procianidinas (89), tendo o cacau em pó utilizado na aromatização 11 ± 1 % de matéria gorda. Os polifenóis no cacau (*Theobroma cacao* L.) apresentam três grupos principais: 3-flavanóis, antocianinas e proantocianidinas (90). Foram referidos, em diversos estudos, como compostos bioativos, com propriedades antioxidantes, anti-radicalar e anticancerígenas (91,92).

O mel de limão (N.º 1 Citrus) é aromatizado com plantas que lhe conferem o aroma cítrico. Os subprodutos do género *Citrus* estão associados a diversos componentes químicos naturais, tais como o ácido cítrico, ácido ascórbico e flavonóides (93). Os flavonóides são um grupo amplamente distribuído de compostos polifenólicos, sendo referidos como antioxidantes em diversos sistemas biológicos (94,95). Os flavonóides estão presentes numa grande variedade de plantas, especialmente em espécies de citrinos. Ao género *Citrus* estão associados quatro tipos de flavonóides (flavanonas, flavonas,

flavonóis e antocianinas (96). No entanto, apesar destes méis aromatizados (amostras N.º 66 Beelove e N.º 1 Citrus) terem sido os que apresentaram maiores valores de capacidade antioxidante não são estatisticamente diferentes em relação ao mel utilizado como base, provavelmente a sua incorporação não foi em suficiente para incrementar esta atividade.

3.2. Análise polínica

A origem floral e geográfica constitui aspetos importantes da qualidade, influenciando significativamente o valor comercial do mel (16). Os resultados da análise polínica permitiram determinar a origem floral de cada amostra, com o intuito de confirmar a flora indicada pelos apicultores e classificar os tipos de mel.

No mel de inverno (tabela 8) foram identificados seis tipos de pólen diferentes, sendo predominante o de eucalipto (89,07%), sendo as restantes percentagens minoritárias. O resultado desta análise confirma a flora maioritária, referida pelo apicultor, para esta estação do ano (*Eucalyptus spp*). Em Portugal existe o *E. globulus* L. e estas árvores ocupam 20% da área florestal. A sua importância económica deve-se, essencialmente, à qualidade das fibras de celulose, utilizadas pelas indústrias de celulose (97).

Tabela 8 - Predominância de pólenes no mel de Oliveira de Azeméis (mel de inverno).

Amostra	Famílias	Identificação do Pólen (%)	Classe de Frequência ^a
Mel de Oliveira de Azeméis (Mel inverno-8 meses de maturação)	<i>Myrtaceae</i>	<i>Eucalyptus spp</i> (89,07)	Pólen Predominante
	<i>Boraginaceae</i>	<i>Echium plantagineum</i> (5,15)	Pólen Minoritário Importante
	<i>Cistaceae</i>	<i>Cistus ladanifer</i> (2,08)	Pólen Minoritário
	<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus robur</i> (1,59)	
	<i>Asparagaceae</i>	<i>Muscari spp</i> (1,11)	
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Brassica spp</i> (0,99)	

^a pólen predominante (> 45%); pólen secundário (16-45%); pólen minoritário importante (3-15%); pólen minoritário (1-3%).

No mel de verão foram identificados quinze tipos de pólen diferentes, sendo considerado um mel multifloral (tabela 9). Os tipos de pólen de castanheiro (*Castanea sativa*) e urze (*Erica spp*) apresentaram as percentagens mais elevadas com 38,70 e 14,98, respetivamente. Méis caracterizados por grãos de pólen sobrerrepresentados, como a *Castanea sativa*, necessitam de uma quantidade de pólen entre 70 a 90% para serem considerados monoflorais (16).

Tabela 9 - Predominância de pólenes no mel de Oliveira de Azeméis (mel verão).

Amostra	Família	Identificação do Pólen (%)	Classe de Frequência ^a
Mel de Oliveira de Azeméis (Mel verão-4 meses de maturação)	<i>Fagaceae</i>	<i>Castanea sativa</i> (38,70)	Pólen Secundário
	<i>Ericaceae</i>	<i>Erica spp</i> (14,98)	Pólen Minoritário Importante
	<i>Oleaceae</i>	<i>Olea europaea</i> (6,29)	
	<i>Rosaceae</i>	<i>Rubus spp</i> (6,22)	
	<i>Myrtaceae</i>	<i>Eucalytus spp</i> (6,12)	
	<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus robur</i> (5,44)	
	<i>Apiaceae</i>	<i>Foeniculum vulgare</i> (4,91)	
	<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus spp</i> (4,61)	
	<i>Asteraceae</i>	<i>Taraxacum officinale</i> (3,51)	Pólen Minoritário
	<i>Salicaceae</i>	<i>Salix alba</i> (2,94)	
	<i>Fabaceae</i>	<i>Trifolium spp</i> (2,29)	
	<i>Cistaceae</i>	<i>Cistus ladanifer</i> (2,23)	
	<i>Fabaceae</i>	<i>Mimosa spp</i> (1,75)	

^a pólen predominante (> 45%); pólen secundário (16-45%); pólen minoritário importante (3-15%); pólen minoritário (1-3%).

Relativamente aos dois méis provenientes da mesma área geográfica e do mesmo produtor, verificou-se que o mel de inverno é monofloral de eucalipto (*Eucalytus spp*) (tabela 8), sendo a única amostra com pólen predominante (89,07%) e o de verão é multifloral (tabela 9). Regra geral, são considerados méis monoflorais da espécie vegetal que o originou, quando apresentam um tipo de pólen dominante, em quantidades superiores a 45% do total dos pólenes observados no mel (16). No entanto, há espécies vegetais em que os grãos de pólen estão sub-representados, significando que a percentagem de pólen no mel é inferior à respetiva percentagem de néctar incorporado

pelas abelhas. Noutros casos, a situação é inversa (sobrerrepresentação polínica), como já referido anteriormente, para o mel de castanheiro (*Castanea sativa*). Assim, as espécies vegetais com sub-representação polínica como, por exemplo, o mel de lavanda ou rosmaninho apresentam frequências polínicas relativamente baixas, sendo considerados monoflorais com 10 a 20% desses tipos de pólen (9).

No mel base, a amostra com uma origem geográfica diferente, foram identificados quinze tipos de pólen (tabela 10), sendo considerado mel multifloral. As maiores percentagens identificadas foram de *Castanea sativa* (36,41%) e de *Echium plantagineum* (16,83%). Alguns tipos de pólen identificados foram referidos na flora mencionada pelo apicultor como, por exemplo, os castanheiros (*Castanea sativa*), giestas (*Cytisus* spp), urzes (*Erica* spp) e estevas (*Cistus ladanifer*). A flora predominante da zona de Trás-os-Montes incide em famílias como *Fagaceae*, *Fabaceae*, *Boraginaceae*, *Ericaceae*, *Cistaceae*, estando presentes neste espectro polínico (18).

Tabela 10 - Predominância de pólenes no mel de Vila Real (mel base).

Amostra	Famílias	Identificação do Pólen (%)	Classe de Frequência ^a
Mel de Vila Real (Mel base-2 meses de maturação)	<i>Fagaceae</i>	<i>Castanea sativa</i> (36,41)	Pólen Secundário
	<i>Boraginaceae</i>	<i>Echium plantagineum</i> (16,83)	
	<i>Fabaceae</i>	<i>Trifolium</i> spp (7,92)	Pólen Minoritário Importante
	<i>Asphodelaceae</i>	<i>Asphodelus aestivus</i> (4,95)	
	<i>Fabaceae</i>	<i>Cytisus</i> spp (4,93)	
	<i>Rosaceae</i>	<i>Rubus</i> spp (4,38)	
	<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus</i> spp (3,95)	
	<i>Oleaceae</i>	<i>Olea europaea</i> (3,67)	
	<i>Campanulaceae</i>	<i>Campanula rapunculus</i> (3,33)	
	<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus</i> spp (2,82)	Pólen Minoritário
	<i>Ericaceae</i>	<i>Erica</i> spp (2,72)	
	<i>Asteraceae</i>	<i>Helianthus</i> spp (2,46)	
	<i>Fagaceae</i>	<i>Quercus robur</i> (2,29)	
	<i>Cistaceae</i>	<i>Cistus ladanifer</i> (2,15)	
	<i>Lamiaceae</i>	<i>Lavandula sampaiana</i> (1,20)	

^a pólen predominante (> 45%); pólen secundário (16-45%); pólen minoritário importante (3-15%); pólen minoritário (1-3%).

A família *Boraginaceae* (*Echium plantagineum*) está presente em duas amostras (mel de inverno e mel base), sendo uma família botânica presente em várias regiões de Portugal e Espanha. É considerada uma planta invasiva em alguns países, mas uma das mais relevantes no mel, sendo mais característica de méis multiflorais e tendo também diversas utilizações na área da cosmética (18). Outra família com relevância apícola é *Ericaceae*, visto ser uma fonte de néctar e pólen e de apresentar diferentes épocas de floração (18,98).

Os géneros *Rubus*, *Castanea*, *Quercus* e *Erica* são tipos de pólenes característicos de méis de Portugal e do Norte de Espanha, estando presentes na amostra de mel de Vila Real (mel base) (99). As árvores do género *Quercus* são predominantes tanto em zonas de montanha como de planície, estando o seu tipo de pólen presente nas três amostras. Já as plantas produtoras de néctar, como por exemplo *Thymus sp* (presente apenas no mel de Vila Real), são predominantes de zonas planas (9) e bastante presentes na flora de Trás-os-Montes (18).

Em relação ao mel monofloral de eucalipto, num outro estudo realizado com o mesmo tipo de amostra (mel de eucalipto de Portugal) foram identificados tipos de pólen iguais aos identificados nesta análise como *Eucalyptus spp*, *Echium plantagineum*, *Brassica spp* e *Quercus robur*. Os eucaliptos são árvores bastante abundantes na costa Atlântica e no norte da Península Ibérica (99).

As variações nos tipos de pólen, em junção com outros fatores como as condições climáticas, tipo de solo, atividade do apicultor e flora circundante ao apiário, contribuem para a existência de diferentes tipos de mel (7,100).

3.3. Análise dos compostos voláteis

3.3.1. Compostos voláteis dos méis sem aromatização

As três amostras de mel sem aromatização foram analisadas em relação à sua composição volátil. Na figura 14 estão representadas todas as famílias de compostos identificadas nos méis sem aromatização. As famílias químicas a que pertencem os compostos voláteis dos méis incluem: ácidos, álcoois alifáticos e aromáticos, aldeídos, terpenos e norisoprenóides. O perfil volátil do mel base apresentou uma maior área

cromatográfica de compostos na família dos aldeídos e menor área no que diz respeito aos álcoois aromáticos e sesquiterpenos. No mel de verão os aldeídos são a classe mais representativa e os álcoois alifáticos e aromáticos os que se encontram em menor quantidade. O mel de inverno apresentou maiores áreas cromatográficas nos aldeídos e monoterpênos e áreas menores, nos ácidos e álcoois aromáticos.

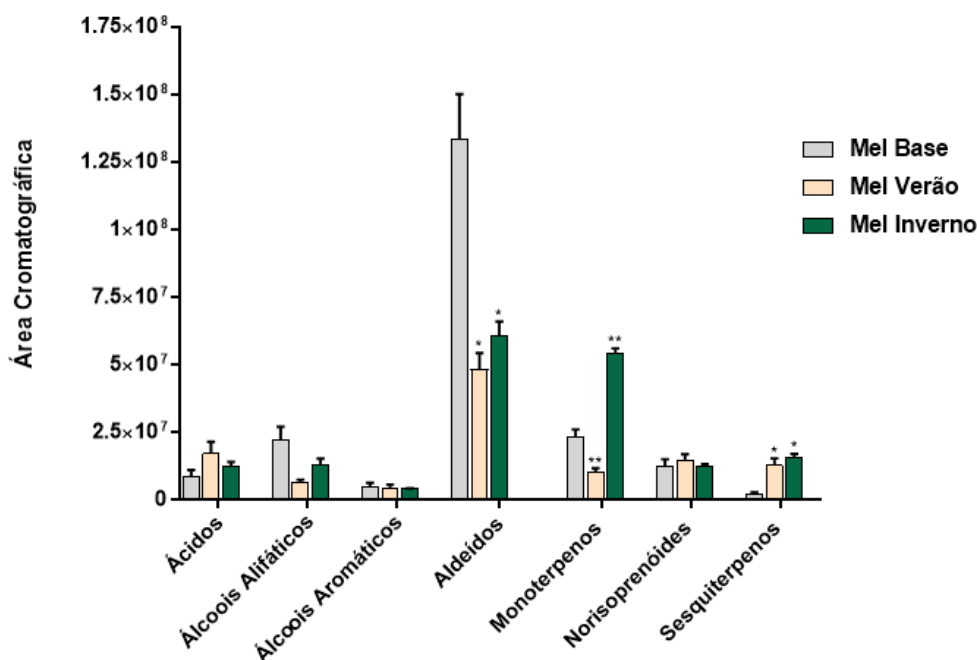


Figura 14 - Famílias de compostos voláteis identificadas nos méis sem aromatização. Resultados expressos em valor médio de área cromatográfica±erro e comparados com o mel base *p<0.05, **p<0.01.

Na tabela 11 encontram-se indicados os compostos voláteis identificados no espaço de cabeça dos três méis sem aromatização. Foram identificados, no total, 15 compostos no mel base, 19 no mel de verão e 18 no mel de inverno. De uma maneira geral, observa-se, a partir da tabela 11, que os perfis voláteis dos méis não diferem muito entre si, com algumas diferenças mais significativas ao nível dos aldeídos, monoterpênos e sesquiterpenos. A maior família de compostos voláteis encontrada neste estudo foi a dos terpenos (11 compostos identificados). Os terpenos estão envolvidos em interações entre plantas e insetos polinizadores e também na função de defesa ou de resposta ao stress, como referido anteriormente (68).

Relativamente aos ácidos alifáticos foram identificados 3 compostos, estando todos presentes apenas no mel de verão. Os ácidos carboxílicos, dependendo do tamanho da cadeia alifática, possuem diferentes descritores de aromas, variando desde o picante até ao

azedo. Ácidos aromáticos, como o ácido benzóico, possuem aroma e sabores pungentes, enquanto os ácidos alifáticos como o nonanóico e o decanóico estão associados ao aroma azedo e gorduroso, tendo origem nos ácidos gordos saturados (14,101). Alguns ácidos com número ímpar de carbonos são importantes constituintes do aroma de alguns alimentos (14).

No que diz respeito aos álcoois alifáticos apenas foi identificado o 1-nonanol nas três amostras, estando associado a aromas verdes e suaves. Aldeídos e álcoois em C₆ e C₉ influenciam bastante os aromas e sabores característicos a verde e frutado, sendo utilizados como aditivos alimentares. Estes tipos de compostos (C₆ e C₉), resultantes da ação da lipoxigenase nos ácidos gordos, servem como elementos de proteção (102). Os diferentes substratos e a especificidade das reações enzimáticas são fatores que influenciam a presença ou ausência de determinados compostos voláteis nas plantas. Por exemplo, quando ocorre a destruição do tecido vegetal, o oxigênio consegue permear pelas células vegetais, levando a uma intensificação da reação (14).

Foram identificados dois álcoois aromáticos, fenilmetanol e 2-fenil-etanol, nas três amostras, tendo este último um aroma similar a mel. São compostos já identificados em estudos realizados com méis monoflorais (83).

Na classe dos aldeídos foram identificados 3 compostos, destacando-se o nonanal e o decanal pela área cromatográfica. Estes compostos estão associados a aromas cítricos, verdes e picantes, sendo formados através da auto-oxidação de ácidos gordos insaturados (14).

Na classe dos monoterpenos foram identificados quatro compostos. Destes compostos, o α -3-careno e o *p*-menta-1,5,8-trieno foram identificados nas três amostras, sendo os que apresentaram maiores valores de áreas cromatográficas. O canfeno foi identificado no mel base e no de inverno e o limoneno exclusivamente no mel de verão. Estes compostos apresentam, no geral, aromas frutados.

Na classe dos norisoprenóides foram identificados três compostos, sendo comum nas três amostras apenas o 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidro-naftaleno (TDN). O composto geranil acetona, identificado no mel de inverno (monofloral), apresenta aromas frescos, florais e frutados e a *trans*- β -damascenona (mel base e de verão) está associado ao aroma característico do mel. Os compostos *trans*- β -damascenona e 1,1,6-trimetil-1,2-di-hidro-naftaleno derivam ambos da neoxantina e a geranil acetona deriva do fitoeno (68,73).

Em relação à classe dos sesquiterpenos foram identificados 6 compostos. Apenas o β -selineno e o α -selineno são comuns nas três amostras, com aroma a ervas e a laranja, respectivamente. O composto aromadendreno foi apenas identificado no mel monofloral de eucalipto (mel inverno), estando presente em óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* (103).

Tabela 11 - Compostos voláteis identificados por HS-SPME/GC-qMS nos três méis sem aromatização.

Compostos	Área cromatográfica × 10 ⁵			Descritores de aroma ^a	Limiar de detecção de odor (ppb) ^b
	Mel base	Mel verão	Mel inverno		
Ácidos					
Nonanóico	57,9 (54)	50,3 (47)	75 (11)	Verde, gordura, mofo, azedo	500
Decanóico	29,1 (38)	52 (57)	17,3 (42)	Gordura, seco, amadeirado	1000
Benzóico	-----	69,7 (38)	-----	Doce	-----
Subtotal	87	172	92,3		
Álcoois Alifáticos					
1-nonanol	222 (38)	63,8 (29)	132 (27)	Gorduroso, suave, verde	50
Subtotal	222	63,8	132		
Álcoois Aromáticos					
Fenilmetanol	18,7 (39)	16,3 (46)	23,1 (6)	-----	-----
2-feniletanol	31,3 (50)	28,6 (51)	17,5 (15)	Rosas, mel	750-1100
Subtotal	50	44,9	40,6		
Aldeídos					
Octanal	61,3 (22)	32,2 (41)	37,5 (23)	Cítrico, verde	0,7
Nonanal	1050 (33)	336 (27)	444 (12)	Cítrico, picante	1
Decanal	230 (34)	115 (15)	128 (33)	Picante, verde, coentros, casca de laranja	2
Subtotal	1341,3	483,2	609,5		
Monoterpenos					
Canfeno	14,5 (6)	-----	18,5 (14)	Doce, frutado, cânfora, pinheiro, ervas, óleo	-----
δ-3-careno	39,1 (22)	64,7 (42)	261 (18)	Cítrico, doce, verde, aroma a manga	140
Limoneno	-----	6,76 (23)	-----	Licoroso, cítrico, frutado	10
<i>p</i> -menta-1,5,8-trieno	180 (28)	38 (20)	263 (26)	Torrado	-----
Subtotal	233,6	109,46	542,5		
Norisoprenóides					
1,1,6-trimetil-1,2-di-hidro-naftaleno	89,1 (32)	129 (28)	90,1 (22)	Medicinal	-----
Geranyl acetona	-----	-----	65,2 (4)	Fresco, floral, rosas, verde, frutado	9
<i>trans</i> -β-damascenona	37,6 (38)	14,8 (45)	-----	Maçã cozida, mel, rosa	0,05
Subtotal	126,7	143,8	155,3		
Sesquiterpenos					
Aromadendreno	-----	-----	41,7 (24)	Doce, seco	-----
β-selineno	12,8 (20)	11,9 (21)	19 (33)	Ervas	-----
α-selineno	11,6 (30)	12,9 (36)	17,8 (27)	Pimenta, laranja	-----
β-malieno	-----	-----	14,5 (32)	Amadeirado	-----
δ-cadineno	-----	58,9 (36)	33,2 (7)	Ervas	-----
Cadina-1,4-dieno	-----	34,3 (51)	-----	Frutado, picante	-----
α-calacoreno	-----	10 (14)	-----	Seco, amadeirado	-----
Subtotal	24,4	128	126,2		

A identificação foi efetuada por: comparação com espectros de massa presentes na base de dados Wiley; comparação com os espectros de massa encontrados na literatura (base de dados Pherobase e NIST); ^a Descritores mencionados nas referências bibliográficas (14,104–106). ^b Limites de detecção sensorial mencionados nas referências bibliográficas (82,105–108).

O mel que serve de base a posteriores aromatizações deve ser o mais neutro possível. Deste modo, foi realizada a comparação, em termos estatísticos, das três amostras de méis, de diferentes localizações e com diferentes tempos de maturação na colmeia, 2, 4 e 8 meses. Foram analisadas as amostras de mel de verão (4 meses) e de inverno (8 meses), ambas provenientes de Oliveira de Azeméis, em relação ao mel que serviu de base, proveniente de Vila Real e com apenas 2 meses de maturação. Foram comparados os valores médios das áreas totais de quatro famílias de compostos que contribuem maioritariamente para o aroma (aldeídos, monoterpenos, norisoprenóides e sesquiterpenos).

No que diz respeito à família dos aldeídos, o mel base apresentou o maior valor médio de área total, tendo um resultado estatisticamente diferente em comparação com o mel de verão ($p=0,0192$) e o mel de inverno ($p=0,0265$). Os aldeídos identificados apresentam baixos limites de percepção de odor, influenciando o aroma.

Na família dos monoterpenos, o mel de inverno apresentou um maior valor médio de área total, tendo um resultado estatisticamente significativo ($p=0,0089$). O mel de verão foi o que apresentou o menor valor médio de área total de monoterpenos ($p=0,0015$).

Em relação à família norisoprenóides não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o mel de verão ($p=0,5641$) e o de inverno ($p=0,9776$) comparativamente com o mel base. Estes compostos, resultantes da degradação de carotenóides e com um baixo limite de percepção sensorial, apresentam um elevado impacto no aroma do mel (67).

Por último, o mel base apresentou o menor valor médio de área total de sesquiterpenos, em comparação com as duas outras amostras. Os méis de verão e de inverno denotaram valores médios superiores, sendo estatisticamente diferentes, em relação ao mel base ($p=0,0458$ e de $p=0,0158$, respetivamente). Este resultado pode estar relacionado com a origem geográfica do mel, visto que tanto o mel de verão como o de inverno são provenientes do mesmo apiário e a composição volátil é influenciada por esse fator.

Tendo por base os resultados entre as três amostras, o mel de inverno apresentou valores médios elevados nas famílias dos monoterpenos, norisoprenóides e sesquiterpenos e, sendo um mel monofloral, aparenta ser o menos adequado a posteriores aromatizações. O mel de verão apresentou um valor médio de área total de monoterpenos inferior às duas

outras amostras. Em relação aos norisoprenóides e sesquiterpenos, apresentou resultados semelhantes ao mel de inverno e na família dos aldeídos apresentou o menor valor médio das três amostras. O mel de verão e o de inverno têm a mesma origem geográfica, mas apresentam tempos de recolha distintos, sendo a flora circundante ao apiário diferente, influenciando deste modo o perfil volátil. Apresentam ainda um tempo de maturação distinto. Assim, tendo em consideração estes resultados, os méis que possivelmente são mais adequados a aromatizações são o já utilizado como base e o mel de verão.

3.3.1.1. Relação dos compostos voláteis com a origem floral do mel

As características do mel como o aroma, sabor e cor, dependem predominantemente do tipo de flores ou plantas de onde as abelhas recolhem o néctar ou melada, sendo que os compostos voláteis derivam essencialmente da origem floral. A fim de definir um composto como marcador da origem floral, este deve estar presente apenas nas amostras provenientes dessa fonte ou, pelo menos, estar presente numa quantidade muito elevada e constante (73). No entanto, nem sempre há concordância nos compostos propostos como marcadores, uma vez que podem existir diferenças, mesmo dentro de um único tipo de mel monofloral, devido à variedade de plantas, origem geográfica e práticas apícolas (54).

O nonanal, o nonanol e o ácido nonanóico são compostos geralmente identificados em méis de eucalipto, como já foi demonstrado em estudos anteriores (69,74). Os três compostos encontram-se presentes na amostra de mel de eucalipto em estudo, apresentando uma maior área cromatográfica para o aldeído nonanal. Contudo, são compostos também identificados nas duas outras amostras e em diversos tipos de méis.

Muitos tipos de mel são particularmente ricos em monoterpenos, devido ao baixo peso molecular, acabando por ser maioritários em muitos perfis voláteis (67). O monoterpeno δ -3-careno, presente nas três amostras em análise, apresentou uma maior área no mel monofloral de eucalipto (mel de inverno), tendo sido já identificado na família botânica *Brassicaceae* (109,110), presente na análise polínica. Outro monoterpeno que apresentou uma maior área no mel monofloral foi o *p*-menta-1,5,8-trieno, estando presente na composição volátil de óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus spp*) (111,112).

No que diz respeito à composição em compostos terpênicos C₁₀ e C₁₅ num estudo com folhas secas de *E. globulus* L. verificou-se que os compostos maioritários foram o isômero do *allo*-aromadendreno, o 1,8-cineol, o limoneno, o α -pineno, o aromadendreno e o *p*-cimeno (113). Na amostra de mel monofloral de eucalipto em estudo, identificou-se o aromadendreno. O sesquiterpeno aromadendreno, nas três amostras em análise, só foi identificado no mel de eucalipto, tendo sido também já identificado em óleos essenciais de *Eucalyptus spp.* Outros sesquiterpenos também identificados e presentes nos óleos essenciais são o α -selineno e δ -cadineno. O β -selineno, presente no mel base e de verão, foi também já identificado na composição volátil de *Olea europaea*, tipo de pólen que consta da análise polínica desses méis (114).

3.3.2. Compostos voláteis dos méis com aromatização

As seis amostras de mel aromatizado foram analisadas relativamente ao seu perfil volátil. Na figura 15 encontram-se as famílias identificadas nas amostras de mel em estudo. As famílias químicas a que pertencem os compostos voláteis dos méis incluem: ácidos, álcoois alifáticos, álcoois aromáticos, aldeídos, terpenos e norisoprenóides. A classe de compostos que mais se destacou no mel aromatizado com menta, limão e canela foi a dos monoterpenóides. A segunda classe de compostos com maiores valores médios de área identificados, nas seis amostras, foi a dos aldeídos.

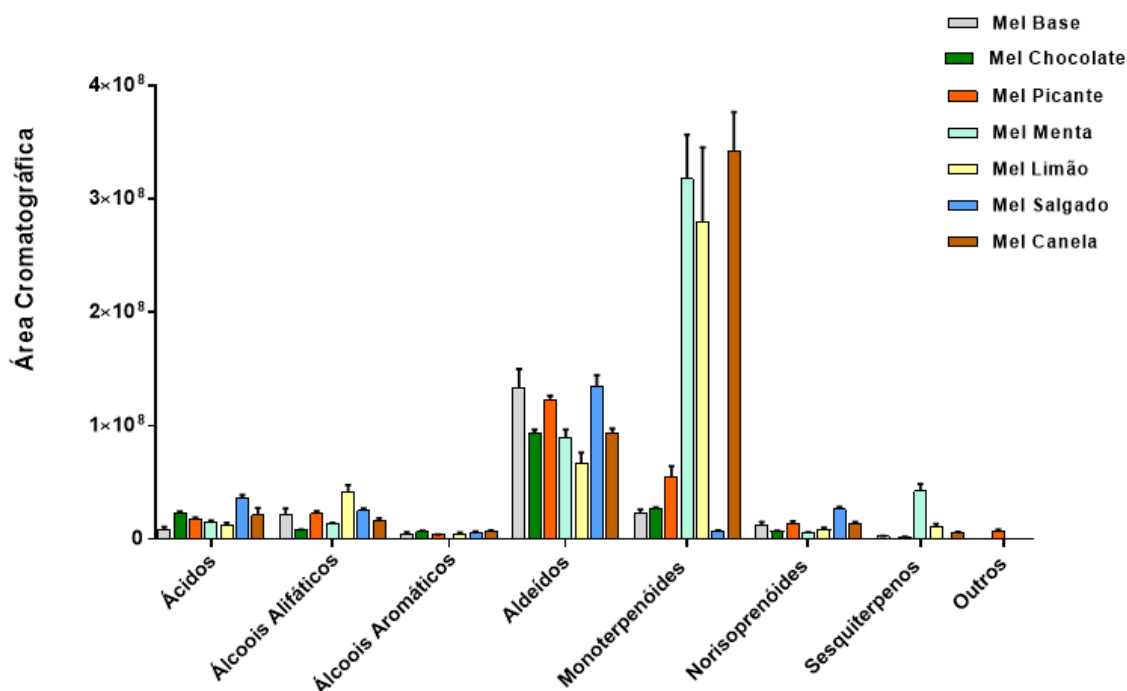


Figura 15 - Famílias de compostos voláteis identificadas nos méis com aromatização. Resultados expressos em valor médio de área cromatográfica±erro.

De uma maneira geral, pode ser observado, a partir da tabela 12, que os perfis voláteis dos méis diferem entre si, com algumas diferenças mais significativas ao nível dos monoterpenóides, sesquiterpenos e norisoprenóides. A maior família de compostos voláteis encontrada neste estudo foi a dos terpenos (monoterpenóides e sesquiterpenos) com 25 compostos identificados.

No mel aromatizado com chocolate (N.º66 Beelove) foram identificados 2 ácidos, 2 álcoois alifáticos, 2 álcoois aromáticos, 3 aldeídos, 4 monoterpenos e 2 norisoprenóides. Os compostos que apresentaram maiores valores de áreas cromatográficas foram os ácidos (octanóico e nonanóico) e os aldeídos (nonanal e decanal). Os aldeídos mencionados apresentam valores de limiar de deteção de odor baixos e estão associados a aromas cítricos e picantes. Os compostos nonanal e 2-feniletanol, presentes nesta amostra, foram anteriormente identificados num estudo realizado com amostras de chocolate negro (85), sendo o último composto também identificado em cacau em pó (14). Os óxidos de linalol, presentes apenas nesta amostra, são um dos compostos mencionados como contributivos para o aroma do cacau em pó (14).

Em relação ao mel aromatizado picante (N.º 88 Fire) foram identificados 3 ácidos, 1 álcool alifático, 1 álcool aromático, 3 aldeídos, 5 monoterpenos, 2 norisoprenóides, 2 sesquiterpenos e um fenilpropanóide (eugenol). Os compostos α -selineno e nonanal estão associados a aromas picantes, tendo este último apresentado um valor elevado de área cromatográfica. O eugenol, composto apenas identificado neste mel, presente nos óleos essenciais de cravinho (115), pode contribuir para o aroma picante, apresentando um baixo valor de percepção sensorial (tabela 12).

No mel aromatizado menta (N.º 5 Winter) foram identificados 2 ácidos, 1 álcool alifático, 2 álcoois aromáticos, 3 aldeídos, 8 monoterpenóides, 2 norisoprenóides e 3 sesquiterpenos. O 1,8-cineol foi o composto encontrado com o maior valor de área cromatográfica, estando associado ao aroma de eucalipto. O α -pineno foi o segundo monoterpeno com maior valor de área identificado, apresentando aromas frutados, frescos e amadeirados. Ao nível dos sesquiterpenos, foram identificados em maior valor o aromadendreno e *allo*-aromadendreno, apresentando aromas doces e amadeirados, respetivamente. Os compostos 1,8-cineol, limoneno e α -pineno foram dos compostos que apresentaram maiores valores, tendo sido também identificados num estudo de óleos essenciais das folhas e flores de hortelã-pimenta (116).

O perfil volátil do mel aromatizado limão (N.º Citrus) é constituído por 2 ácidos, 2 álcoois alifáticos, 2 álcoois aromáticos, 3 aldeídos, 9 monoterpenóides, 2 norisoprenóides e 3 sesquiterpenos. O composto presente com maior valor de área cromatográfica foi o monoterpeno limoneno, estando associado a aromas cítricos e frutados. Outros monoterpenos associados a aromas cítricos e que também foram identificados são o α -pineno, 2-careno, *trans*- β -ocimeno e γ -terpineno. O aldeído nonanal também apresentou um valor de área elevado, registando um aroma cítrico e picante. Os ácidos nonanóico e decanóico, o álcool nonanol, o aldeído nonanal e o norisoprenóide β -damascenona, já anteriormente identificados num estudo de méis cítricos (117), são também compostos presentes nesta amostra.

No mel aromatizado salgado (N.º 10 Seasalt) foram identificados 2 ácidos, 2 álcoois alifáticos, 2 álcoois aromáticos, 3 aldeídos, 2 monoterpenos e 3 norisoprenóides. O norisoprenóide geranil acetona, associado a aromas frescos e com baixo valor de deteção de odor, o que contribui de forma positiva para o aroma, foi apenas identificado neste tipo

de mel. Este norisoprenóide, em estudos realizados com algas, foi identificado como sendo produzido por estas (118).

Em relação ao mel aromatizado canela (N.º 25 Christmas) foram identificados 2 ácidos, 1 álcool alifático, 2 álcoois aromáticos, 4 aldeídos, 15 monoterpenóides, 2 norisoprenóides e 3 sesquiterpenos. Os compostos 1,8-cineol, cânfora, *p*-menta-1,5,8-trieno e limoneno foram os monoterpenóides que apresentaram maiores valores de áreas cromatográficas. Em suma, o mel aromatizado com canela é o que apresenta maior número de compostos terpênicos, principalmente monoterpenos. Em estudos realizados com óleos essenciais das folhas e cascas de canela, foram também identificados os compostos voláteis canfeno, 1,8-cineol, limoneno, cânfora, γ -terpineno, α -felandreno, α -pineno, β -pineno e *p*-cimeno (119,120).

As aromatizações que mais contribuíram para um aumento dos compostos terpênicos presentes no mel e das áreas dos compostos já identificados foram as de canela, limão e menta. O número de terpenos identificados quadruplicou no mel canela e duplicou na aromatização limão e menta. Esses compostos apresentam, maioritariamente, aromas agradáveis (eucalipto, frutado, cítrico, doce, entre outros), sendo que alguns exibem baixos limites de percepção sensorial, contribuindo positivamente para o aroma.

Várias características dos compostos voláteis têm vindo a ser associadas a propriedades benéficas para a saúde. Os terpenos são dos maiores grupos de compostos naturais e com propriedades bioativas, existindo vários em estudo (58). O composto 1,8-cineol, maioritário nos méis aromatizados canela ou menta, é utilizado em infeções respiratórias, apresentando propriedades antimicrobianas e antisépticas (121). O limoneno, presente no mel base e em maior valor nos méis aromatizados limão, menta ou canela, tem sido utilizado em estudos *in vitro* e em animais modelo, em função da ação preventiva contra alguns tipos de cancro (122). Ao composto α -pineno, identificado no mel aromatizado de menta, já foram atribuídas várias propriedades benéficas devido à ação antimicrobiana e anti-inflamatória (estudos *in vitro*) (123). O eugenol, identificado apenas no mel aromatizado picante, é outro composto natural utilizado, devido às suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. Dado que apresenta uma baixa toxicidade é já utilizado nas áreas da cosmética e farmacêutica (115).

Tabela 12 - Compostos voláteis identificados por HS-SPME/GC-qMS nos seis méis com aromatização.

Compostos	Área cromatográfica × 10 ⁵						Descritores de aroma ^a	Limiar de detecção de odor (ppb) ^b
	Mel Chocolate	Mel Picante	Mel Menta	Mel Limão	Mel Salgado	Mel Canela		
Ácidos								
Octanóico	111 (14)	48,7 (4)	-----	-----	-----	-----	Gordura, seco	500
Nonanóico	125 (3)	90,7 (18)	99,1 (19)	85 (32)	160 (11)	133 (47)	Verde, gordura, mofo, azedo	3000
Decanóico	-----	40,5 (20)	43,7 (19)	43,7 (21)	57,9 (15)	80,9 (52)	Gordura, seco, amadeirado	1000
Subtotal	236	179,9	142,8	128,7	217,9	213,9		
Álcoois Alifáticos								
1-octanol	27,8 (26)	-----	-----	-----	44,8 (40)	-----	Pão torrado, metálico	110-130
Nonanol	-----	-----	-----	211 (27)	-----	-----	Gorduroso, suave, verde	50
1-nonanol	51,7 (8)	193 (19)	136 (9)	201 (30)	234 (20)	32,5 (19)		
Subtotal	79,5	193	136	212	278,8	32,5		
Álcoois Aromáticos								
Fenilmetanol	14,3 (16)	-----	14,5 (24)	10 (51)	14,2 (12)	24,7 (33)	-----	
2-feniletanol	53,5 (21)	41,2 (7)	35,2 (6)	30 (61)	47,5 (22)	40,9 (40)	Rosas, mel	750-1100
Subtotal	67,8	41,2	49,7	40	61,7	65,6		
Aldeídos								
Octanal	46,8 (21)	37,8 (2)	24,4 (24)	31,2 (9)	77,7 (33)	34,4 (32)	Cítrico, verde	0,7
Nonanal	533 (30)	1046 (6)	841 (15)	533 (30)	1117 (15)	779 (6)	Cítrico, picante	1
Decanal	103 (6)	138 (8)	129 (20)	103 (6)	149 (3)	129 (20)	Picante, verde, coentros, casca de laranja	2
Subtotal	682,8	1221,8	994,4	667,2	1369,4	942,4		

A identificação foi efetuada por: comparação com espectros de massa presentes na base de dados Wiley; comparação com os espectros de massa encontrados na literatura (base de dados Pherobase e NIST);

^a Descritores mencionados nas referências bibliográficas (14,104–106,124)

^b Limites de detecção sensorial mencionados nas referências bibliográficas (14,82,107,108,124–128)

Tabela 12 - Cont. Compostos voláteis identificados por HS-SPME/GC-qMS nos seis méis com aromatização.

Compostos	Área cromatográfica × 10 ⁵						Descritores de aroma ^a	Limiar de detecção de odor (ppb) ^b
	Mel Chocolate	Mel Picante	Mel Menta	Mel Limão	Mel Salgado	Mel Canela		
Monoterpenóides								
α -pineno	-----	-----	592 (42)	40 (26)	-----	45,4 (31)	Frutado, doce, verde, amadeirado, pinheiro, cítrico, lima	6
Canfeno	-----	-----	-----	-----	-----	97 (26)	Doce, frutado, cânfora, pinheiro, ervas, óleo	-----
2-careno	-----	-----	-----	70 (34)	-----	-----	Doce, cítrico, agulha de abeto	-----
β -pineno	-----	-----	31,3 (54)	300 (59)	-----	51,8 (16)	Doce, pinho, amadeirado, verde	140
2- β -pineno	-----	-----	-----	-----	-----	39,7 (23)	-----	-----
Sabineno	-----	19,5 (7)	33,9 (32)	-----	-----	121 (24)	Fresco, cítrico, picante, doce, amadeirado	980
δ -3-careno	51 (8)	48,2 (36)	45,3 (14)	60 (18)	46,6 (17)	-----	Cítrico, doce, verde, aroma a manga	44
α -terpineno	-----	-----	-----	-----	-----	54,2 (21)	Frutado, cítrico	-----
Limoneno	-----	21,6 (26)	532 (38)	2000 (36)	22,7 (51)	118 (20)	Licoroso, cítrico, frutado	10
α -felandreno	-----	-----	-----	-----	-----	23,9 (17)	Frutado, menta, ervas, lima, pimenta, zimbro	-----
1,8-cineol	-----	-----	1860 (6)	50 (25)	-----	2000 (14)	Eucalipto	1,3
γ -terpineno	-----	-----	-----	60 (19)	-----	82 (24)	Cítrico, frutado, doce, ervas	250
<i>trans</i> - β -ocimeno	-----	-----	-----	70 (42)	-----	99,5 (35)	Ervas, suave, cítrico, doce, laranja, limão	-----
<i>p</i> -cimeno	-----	-----	-----	-----	-----	60,5 (41)	Limão, frutado, doce, ervas, picante	120
Terpinoleno	-----	-----	39,8 (15)	-----	-----	-----	Doce, pinho	200
α -terpinoleno	43 (15)	139 (63)	-----	-----	-----	42,4 (23)	Frutado, doce, anis, pinho	-----
Óxido de <i>cis</i> linalol	25,5 (23)	-----	-----	-----	-----	-----	Doce, amadeirado, floral, aroma a terra	-----
<i>p</i> -menta-1,3,8-trieno	149 (10)	-----	-----	-----	-----	-----	Amadeirado, pinho, aroma a timol e a cânfora	-----
<i>p</i> -menta-1,5,8-trieno	-----	321 (21)	133 (12)	200 (26)	-----	129 (30)	Torrado	-----
Cânfora	-----	-----	-----	-----	-----	191 (15)	Verde, seco	-----
Subtotal	268,5	549,3	2675,3	2850	69,3	3155,4		

A identificação foi efetuada por: comparação com espectros de massa presentes na base de dados Wiley; comparação com os espectros de massa encontrados na literatura (base de dados Pherobase e NIST);

^a Descritores mencionados nas referências bibliográficas (14,104–106,124);

^b Limites de detecção sensorial mencionados nas referências bibliográficas (14,82,107,108,124–128)

Tabela 12 - Cont. Compostos voláteis identificados por HS-SPME/GC-qMS nos seis méis com aromatização.

Compostos	Área cromatográfica × 10 ⁵						Descritores de aroma ^a	Limiar de detecção de odor (ppb) ^b
	Mel Chocolate	Mel Picante	Mel Menta	Mel Limão	Mel Salgado	Mel Canela		
Norisoprenóides								
1,1,6-trimetil-1,2-dihidro-naftaleno	56,9 (1)	90,1 (22)	20 (20)	90 (28)	112 (20)	76,7 (19)	Medicinal	-----
Geranil acetona	-----	-----	-----	-----	87,3 (34)	-----	Fresco, floral, verde, frutado	60
<i>trans</i> -β-damascenona	16,3 (19)	53,5 (12)	36,2 (18)	30 (39)	64,4 (20)	62,9 (15)	Maçã cozida, mel, rosas	0,05
Subtotal	73,2	143,6	56,2	120	263,7	139,6		
Sesquiterpenos								
Aromadendreno	-----	-----	147 (17)	70 (41)	-----	-----	Doce, seco	-----
<i>Allo</i> -aromadendreno	-----	-----	253 (33)	-----	-----	-----	Amadeirado	-----
β-selineno	-----	9,90 (5)	23,6 (7)	20 (56)	-----	23,2 (30)	Ervas	-----
α-selineno	-----	11,6 (27)	-----	20 (45)	-----	17,3 (24)	Pimenta, laranja	-----
α-calacoreno	-----	-----	-----	-----	-----	19,1 (22)	Seco, amadeirado	-----
Subtotal		21,5	423,6	110		59,6		
Outros								
Eugenol	-----	74,8 (25)	-----	-----	-----	-----	Pimenta, cravinho	6
Subtotal		74,8						

A identificação foi efetuada por: comparação com espectros de massa presentes na base de dados Wiley; comparação com os espectros de massa encontrados na literatura (base de dados Pherobase e NIST);

^a Descritores mencionados nas referências bibliográficas (14,104–106,124).

^b Limites de detecção sensorial mencionados nas referências bibliográficas (14,82,107,108,124–128).

Capítulo IV: Conclusões

4. Conclusões

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar e caracterizar os perfis voláteis de méis com e sem aromatização, sendo também analisados o seu perfil polínico, a capacidade antioxidante e os parâmetros físicos-químicos.

Na determinação dos parâmetros físico-químicos (pH e a atividade da água) foi possível observar que as aromatizações não contribuíram para que os valores ficassem fora dos intervalos de referência. Deste modo, o mel manteve os seus parâmetros de qualidade. Em relação à capacidade antioxidante, o mel de verão foi o que apresentou uma maior atividade e dos méis aromatizados foram os de chocolate e limão.

Pela análise polínica foi possível verificar que, das três amostras de mel sem aromatização, colhidas pelos apicultores em duas zonas geográficas distintas, uma pode ser classificada como mel monofloral de eucalipto (89,1%) e as restantes como méis multiflorais. Esta análise demonstrou ser uma metodologia adequada para se determinar a origem floral, permitindo identificar as espécies de plantas que contribuíram para o mel, relacionando-as com os compostos voláteis identificados. Compostos como o monoterpeneo *p*-menta-1,5,8-trieno e o sesquiterpeneo aromadendreno, identificados no mel monofloral, foram anteriormente identificados em óleos essenciais de *Eucalyptus spp*. A origem floral é um aspeto importante relativamente à qualidade do mel, tendo influência no seu valor comercial.

Pelo estudo da composição volátil é possível retirar informações sobre a caracterização varietal de produtos como o mel. Na análise da composição volátil, a utilização da técnica de HS-SPME/GC-qMS permitiu identificar compostos pertencentes às diferentes classes, tais como álcoois, aldeídos ácidos, terpenóides e norisoprenóides. Nos méis sem aromatização foram identificados maioritariamente aldeídos e compostos terpénicos. No mel monofloral foi possível identificar compostos característicos do eucalipto como o nonanal, o nonanol, o ácido nonanóico, o *p*-mentha-1,5,8-trieno e o aromadendreno, sendo que este último apenas foi identificado neste mel. Nos méis com aromatizações também foram identificados maioritariamente compostos terpénicos e aldeídos. Os compostos identificados com maiores valores de áreas cromatográficas foram o 1,8-cineol, limoneno, nonanal, α -pineno, *p*-menta-1,5,8-trieno e β -pineno, estando associados a aromas com descritores positivos e agradáveis (eucalipto, cítrico, frutado, doce, entre outros) e a possíveis propriedades benéficas para a saúde (antimicrobiana, anti-

inflamatória, entre outras). As aromatizações que mais contribuíram para um aumento dos compostos terpênicos foram as de canela, limão e menta, sendo no mel aromatizado com canela onde se identificou um maior número de compostos. Esses compostos apresentam, maioritariamente, aromas agradáveis (eucalipto, frutado, cítrico, doce, entre outros), sendo que alguns exibem baixos limites de percepção sensorial, contribuindo positivamente para o aroma.

Trabalho Futuro:

No seguimento do trabalho realizado surgiram as seguintes linhas de ação:

- Avaliação da capacidade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, para uma maior valorização dos méis com e sem aromatização;
- Caracterização físico-química das plantas utilizadas nas aromatizações;
- Avaliação de potenciais efeitos benéficos de alguns compostos identificados nas amostras em análise.

Capítulo V: Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

1. Downey G, Hussey K, Daniel Kelly J, Walshe TF, Martin PG. Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chem.* 2005;91(2):347–54.
2. Pisani A, Protano G, Riccobono F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chem.* 2008;107(4):1553–60.
3. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for Nutrition and Health: A Review. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(6):677–89.
4. Manyi-Loh CE, Ndip RN, Clarke AM. Volatile compounds in honey: A review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *Int J Mol Sci.* 2011;12(12):9514–32.
5. Cuevas-Glory LF, Pino JA, Santiago LS, Sauri-Duch E. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem.* 2007;103(3):1032–43.
6. Cordella C, Militão J, Clément M-C, Cabrol-Bass D. Honey Characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. *J Agric Food Chem.* 2003;51(11):3234–42.
7. Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 1998;63(4):549–62.
8. Baroni M, Nores M, Díaz M, Chiabrando G, Fassano J, Costa C. Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry coupled to chemometrics. *J Agric Food Chem.* 2006;54(19):7235–41.
9. Soria AC, González M, Lorenzo C, Martínez-Castroa, I, Sanza J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chem.* 2004;85(1):121–30.
10. Decreto-Lei 214_2003. Diário da República I^a Série A: 6057-60;

11. Koroch AR, Rodolfo HJ, Zygodlo A. Bioactivity of essential oils and their components. In: *Flavours and Fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. 2007. p. 87–115.
12. Isidorov VA, Isidorova AG, Szczepaniak L, Czyzewska U. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chem*. 2009;115(3):1056–63.
13. Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J Food Compos Anal*. 2005;18(1):105–11.
14. Belitz HD, Grosh W, Shieberle P. *Food Chemistry*. 4th ed. Springer; 2009.
15. Von Der Ohe W, Persano Oddo L, Piana ML, Morlot M, Martin P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. 2006;37(1):275–92.
16. Estevinho LM, Feás X, Seijas JA, Pilar Vázquez-Tato M. Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(2):258–64.
17. Louveaux BJ, Maurizio A, Vorwohl G. Methods of melissopalynology. *Int Comm Bee Bot IUBS*. 1970;51(3):139–53.
18. Pires SM, Rodrigues T, Rocha A, Pajuelo A, Pereira O. Caracterização polínica do mel de Trás-os-Montes e Alto Douro. *Rev Port Zootec*. 2005;13(1):1–14.
19. Yilmazer M, Göksu Karagöz S, Ozkan G. Aroma transition from rosemary leaves during aromatization of olive oil. *J Food Drug Anal*. 2016;24(2):299–304.
20. Sousa A, Casal S, Malheiro R, Lamas H, Bento A, Pereira JA. Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;60(1):22–8.
21. Caponio F, Durante V, Varva G, Silletti R, Previtali MA, Viggiani I. Effect of infusion of spices into the oil vs. combined malaxation of olive paste and spices on quality of naturally flavoured virgin olive oils. *Food Chem*. Elsevier Ltd; 2016;202(1):221–8.
22. Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Res*. 2002;22(9):1041–7.

23. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Med J Nutrition Metab.* 2010;3(1):15–23.
24. Zamora MC, Chirife J. Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control.* 2006;17(1):59–64.
25. White JW, Doner LW. Honey composition and properties. In: *Beekeeping in the United States.* 1980. p. 82–91.
26. Olaitan PB, Adeleke OE, Ola IO. Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *Afr Health Sci.* 2007;7(3):159–65.
27. Iurlina MO, Fritz R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *Int J Food Microbiol.* 2005;105(3):297–304.
28. Küçük M, Kolaylı S, Karaoğlu Ş, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.* 2007;100(2):526–34.
29. Persano Oddo L, Piro R. Main european unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie.* 2004;35(1):275–92.
30. Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chem.* 2007;100(4):1649–53.
31. Acquarone C, Buera P, Elizalde B. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chem.* 2007;101(2):695–703.
32. Gleiter R, Horn H, Isengard H. Influence of type and state of crystallisation on the water activity of honey. *Food Chem.* 2006;96(3):441–5.
33. Feas X, Vazquez-Tato MP, Estevinho L, Seijas JA, Iglesias A. Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules.* 2012;17(7):8359–77.
34. Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Med J Nutrition Metab.* 2009;3(1):15–23.
35. Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(6):731–42.

36. Sak-Bosnar M, Sakac N. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chem.* 2012;135(2):827–31.
37. Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J Sci Food Agric.* 2016;96(13):4303–9.
38. Bogdanov S. Honey Composition. In: *Book of Honey.* 2009. p. 1–13.
39. Karabagias IK, Badeka A, Kontakos S, Karabournioti S, Kontominas MG. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chem.* 2014;146(1):548–57.
40. Bogdanov S, Ruoff K, Oddo LP. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie.* 2004;35(1):4–17.
41. Mato I, Huidobro JF, Simal-Lozano J, Sancho MT. Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *J Agric Food Chem.* 2006;54(5):1541–50.
42. Pyrzynska K, Biesaga M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC Trends Anal Chem.* 2009;28(7):893–902.
43. Andersen OM, Markham KR. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Vol. 45, *Angewandte Chemie International Edition.* 2006. 1212 p.
44. Silva TNM, Santos FP, Evangelista-Rodrigues A, Silva EMS. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *J Food Compos Anal.* 2013;29(1):10–8.
45. Silici S, Sagdic O, Ekici L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chem.* 2010;121(1):238–43.
46. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, González-Paramás AM, Damiani E, Astolfi P, Martínez-Sánchez G. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(5):1508–16.
47. Rowland CY, Blackman AJ, Arcy BRD, Rintoule GB. Comparison of organic extractives found in leatherwood (*Eucryphia Lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves. *Food Chem.* 1995;43(3):753–63.
48. Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* 2008;54(4):712–32.

49. Rocha SM. Porque se estudam os compostos voláteis dos alimentos de origem vegetal? *Química* 112. 2009;49–55.
50. Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT. *Sensory evaluation techniques*. 3rd ed. CRC Press. 1999.
51. Dubois D. Les arômes des vins et leurs défauts. *Rev Fr OEnol*. 1993;144:63–72.
52. Escriche I, Visquert M, Juan-Borrás M, Fito P. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chem*. 2009;112(2):329–38.
53. Kaškonienė V, Venskutonis PR, Čeksterytė V. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT - Food Sci Technol*. 2010;43(5):801–7.
54. Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, González-Viñas MA, Pérez-Coello MS. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chem*. 2009;112(4):1022–30.
55. Pichersky E, Gershenzon J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol*. 2002;5(3):237–43.
56. Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J. *Biochemistry of Plant Volatiles 1*. *Plant Physiol*. 2004;135(1):1893–902.
57. Maffei ME, Gertsch J, Appendino G. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Nat Prod Rep*. 2011;28(8):1359–80.
58. Singh B, Sharma RA. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*. 2015;5(2):129–51.
59. Paul MD. *A Biosynthetic approach*. 2nd ed. *Pharmaceutical Sciences*. 2002. 486 p.
60. Mccaskill D, Croteau R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. 1998;16(1):349–55.
61. Rohlf FJ. Essential oil drugs - Terpene composition of aromatic herbs. *Prod Pract Qual Assess Food Crop*. 2004;3(1):73–128.
62. Ruzicka L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Cell Mol Life Sci*. 1953;15(10):357–67.
63. Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*. 1999;16(1):565–74.

64. Chappell J. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* 1995;106(1):1–6.
65. Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. Plant terpenoid synthases : Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(2):4126–33.
66. Oliveira JMM. Aromas varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas Loureiro e Alvarinho. Universidade do Minho; 2001.
67. Jerković I, Kuš PM. Terpenes in honey: occurrence, origin and their role as chemical biomarkers. *RSC Adv.* 2014;4(60):31710–28.
68. Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* 2008;54(4):712–32.
69. Bechoff A, Dhuique-Mayer C, Dornier M, Tomlins KI. Relationship between the kinetics of beta carotene degradation and formation of norisoprenoids in the storage of dried sweet potato chips. *Food Chem.* 2010;121(2):348–57.
70. Winterhalter P, Rouseff R. Carotenoid-derived aroma compounds: an Introduction. *Am Chem Soc.* 2002;8(2):1–15.
71. Ribéreau-Gayon P, Maujean A DD. Handbook of enology Volume 2: The Chemistry of wine and stabilization and treatments. 2nd ed. John Wiley & Sons L, editor. 2006.
72. Sefton MA, Skouroumounis GK, Massy-Westropp RA, Williams PJ. Norisoprenoids in *Vitis vinifera* white wine grapes and the identification of a precursor of damascenone in these fruits. *Aust J Chem.* 1989;42(12):2071–84.
73. Mendes-Pinto MM. Carotenoid breakdown products the norisoprenoids in wine aroma. *Arch Biochem Biophys.* 2009;483(2):236–45.
74. Mandal MD, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1(2):154–60.
75. Bertoneclj J, Doberšek U, Jamnik M, Golob T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* 2007;105(2):822–8.
76. Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(12):3774–9.
77. Aljadi AM, Kamaruddin MY. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* 2004;85(4):513–8.

78. Cavalcante da Silva S, Carvalho C, Estevinho L, Fonseca A. Sensorial profile of *Apis mellifera* honeys produced by familiar farmers in Iguape Bay, Bahia, Brazil. *Magistra*. 2012;24(1):172–8.
79. Ampuero S, Bogdanov S, Bosset JO. Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX. *Eur Food Res Technol*. 2004;218(2):198–207.
80. Ulloa JA, Vázquez JAR, Ulloa JA. Physicochemical characterization of honey from the West region of México. 2012;11(1):7–13.
81. Bayraktar D, Onoğur TA. Investigation of the aroma impact volatiles in Turkish pine honey samples produced in Marmaris, Datça and Fethiye regions by SPME/GC/MS technique. *Int J Food Sci Technol*. 2011;46(5):1060–5.
82. Shimoda M, Wu Y, Osajima Y. Aroma compounds from aqueous solution of haze (*Rhus succedanea*) honey determined by adsorptive column chromatography. *J Agric Food Chem*. 1996;44(12):3913–8.
83. Vázquez LC, Díaz-Maroto MC, Guchu E, Pérez-Coello MS. Analysis of volatile compounds of eucalyptus honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Eur Food Res Technol*. 2006;224(1):27–31.
84. Jinap S, Dimick PS, Hollender R. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control*. 1995;6(2):105–10.
85. Counet C, Callemien D, Ouwerx C, Collin S. Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *J Agric Food Chem*. 2002;50(8):2385–91.
86. Rodriguez-Campos J, Escalona-Buendía HB, Orozco-Avila I, Lugo-Cervantes E, Jaramillo-Flores ME. Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Res Int*. 2011;44(1):250–8.
87. Cimpoi C, Hosu A, Miclaus V, Puscas A. Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2013;100(1):149–54.

88. Stahl L, Miller KB, Apgar J, Sweigart DS, Stuart DA, Mchale N. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. *J Food Sci.* 2009;74(6):456–61.
89. Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr.* 2004;134(3):613–7.
90. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int.* 2000;33(6):423–47.
91. Jalil AMM, Ismail A. Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules.* 2008;13(9):2190–219.
92. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev.* 2003;23(4):519–34.
93. Del Río JA, Fuster MD, Gómez P, Porrás I, García-Lidón A, Ortuño A. Citrus limon: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chem.* 2004;84(3):457–61.
94. Wang PF, Zheng RL. Inhibitions of the autoxidation of linoleic acid by flavonoids in micelles. *Chem Phys Lipids.* 1992;63(1–2):37–40.
95. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(1):13–9.
96. Horowitz R, Gentili B. Flavonoids constituents of *Citrus*. *Citrus Sci Technol.* 1977;1(1):397–426.
97. Silvestre AJD, Cavaleiro AS, Delmondb B, Filliatreb C, Bourgeois G. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. 1997;6(1):27–33.
98. Pires J, Estevinho ML, Feás X, Cantalapiedra J, Iglesias A. Pollen spectrum and physico-chemical attributes of heather (*Erica sp.*) honeys of north Portugal. *J Sci Food Agric.* 2009;89(11):1862–70.
99. Seijo MC, Aira MJ, Méndez J. Palynological differences in the pollen content of Eucalyptus honey from Australia, Portugal and Spain. *Grana.* 2003;42(3):183–90.

100. Luz C, Bacha G, Fonseca RLE, Sousa P. Comparative pollen preferences by africanized honeybees *Apis mellifera* L. of two colonies in Brazil. *Ann Braz Acad Sci.* 2010;82(2):293–304.
101. Barra G, Ponce C. Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble province, Chile. *Chil J Agric Res.* 2010;70(1):75–84.
102. Matsui K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Plant Biol.* 2006;9(1):274–80.
103. Miyamoto CT, Rocha J, Silva CC, Cunico MM. Genotoxic activity of *Eucalyptus globulus* essential oil in *Aspergillus nidulans* diploid cells. *Folia Microbiol (Praha).* 2009;54(6):493–8.
104. Benn SM, Peppard TL. Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *J Agric Food Chem.* 1996;44(2):557–66.
105. Choi H-S. Character impact odorants of *Citrus Hallabong* [(*C. unshiu Marcov* × *C. sinensis Osbeck*) × *C. reticulata Blanco*] cold-pressed peel oil. *J Agric Food Chem.* 2003;51(9):2687–92.
106. Czerny M, Christlbauer M, Christlbauer M, Fischer A, Granvogl M, Hammer M. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur Food Res Technol.* 2008;228(1):265–73.
107. Buttery RG, Seifert RM, Guadagni DG, Ling LC. Characterization of additional volatile components of tomato. *J Agric Food Chem.* 1971;19(3):524–9.
108. Buttery RG, Turnbaugh JG, Ling LC. Contribution of volatiles to rice aroma. *J Agric Food Chem.* 1988;36(5):1006–9.
109. Jakobsen HB, Friis P, Nielsen JK, Olsen CE. Emission of volatiles from flowers and leaves of *Brassica napus in situ*. *Phytochemistry.* 1994;37(3):695–9.
110. Blight MM, Métayer M Le, Delègue M-HP, Pickett JA, Marion-Poll F, Wadhams LJ. Identification of floral volatiles involved in recognition of oilseed rape flowers, *Brassica napus* by honeybees, *Apis mellifera*. *J Chem Ecol.* 1997;23(7):1715–27.
111. Chalchat JC, Chabard JL, Gorunovic MS, Djermanovic V, Bulatovic V. Chemical composition of *eucalyptus globulus* oils from the montenegro coast and east coast of Spain. *J Essent Oil Res.* 1995;7(2):147–52.

112. Mühlen C, Zini CA, Caramão EB, Marriott PJ. Comparative study of *Eucalyptus dunnii* volatile oil composition using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight and quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1200(1):34–42.
113. Santos MRM. Composição terpénica e actividade anti-oxidante de plantas e infusões. Universidade de Aveiro; 2010.
114. Campeol E, Flamini G, Chericoni S, Catalano S, Cremonini R. Volatile compounds from three cultivars of *Olea europaea* from Italy. *J Agric Food Chem*. 2001;49(11):5409–11.
115. Rajput JD, Bagul SD, Pete UD, Zade CM, Padhye SB, Bendre RS. Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids. *Mol Divers*. 2017;1(1):1–21.
116. Rohloff J. Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha x piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J Agric Food Chem*. 1999;47(9):3782–6.
117. Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chem*. 2007;103(2):601–6.
118. Ikawa M, Sasner JJ, Haney JF. Activity of cyanobacterial and algal odor compounds found in lake waters on green alga *Chlorella pyrenoidosa* growth. *Hydrobiologia*. 2001;443(3):19–22.
119. Senanayake UM, Lee TH, Willis RBH. Volatile constituents of cinnamon. *J Agric Food Chem*. 1976;26(4):822–4.
120. Singh G, Maurya S, DeLampasona MP. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(9):1650–61.
121. Juergens UR. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 18-cineole: Current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Res (Stuttg)*. 2014;64(12):1–9.
122. Sun J. Limonene: Safety and Clinical Applications. *Altern Med Rev*. 2007;12(3):259–64.

123. Rufino AT, Ribeiro M, Judas F, Salgueiro L, Lopes MC, Cavaleiro C. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)- α -pinene: Structural and enantiomeric selectivity. *J Nat Prod.* 2014;77(2):264–9.
124. Hausch BJ, Lorjaroenphon Y, Cadwallader KR. Flavor chemistry of lemon-lime carbonated beverages. *J Agric Food Chem.* 2015;63(1):112–9.
125. Guadagni DG, Buttery RG, Okano S. Odour Thresholds of Some Organic Compounds. *J Sci Food Agric.* 1963;14(10):761–5.
126. Guadagni DG, Buttery RG, Harris J. Odor intensities of hop oil components. *J Sci Food Agric.* 1966;17(3):142–4.
127. Buttery RG, Ling LC, Light DM. Tomato leaf volatile aroma components. *J Agric Food Chem.* 1987;35(6):1039–42.
128. Tamura H, Fukuda Y, Padrayuttawat A. Characterization of citrus aroma quality by odor threshold values. *ACS Symp Ser.* 1996;637(7):282–94.

Capítulo VI: Anexos

6. Anexos

Anexo I



FRUTOGAL - INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS ALIMENTARES, LDA.

CAPITAL SOCIAL: 760.198,55 € • CONTRIBUÍVEL: N.º 361.208.100 • SOCIEDADE POR QUOTAS • MATRICULADA NA D. R. C. DE LISBOA SOB O N.º 69832
8 DA JARDIMES, 200 • 1000-048 LISBOA • TEL: 21 361 01 60 • FAX: 21 361 26 42 • 21 361 01 62 • EMAIL: frutogal@frutogal.com.pt • frutogal@comercial.sapo.pt • frutogal@ptd.net.sapo.pt

Especificação Técnica CACAU EM PÓ CIMARRON	Código: 1084100 Data: 29-08-06 Edição: 3 Página 2 de 3
---	---

Público-alvo

Consumidor em geral

Informação nutricional (valores aproximados por 100g de produto)

	Resultado
Valor energético	250,7 Kcal/ 1062,9 kJ
Proteína	23,35g
Hidratos de carbono	15,7g
Lípidos	10,5g

Análise do produto final

Características físicas

Teste	Valor standard	Tolerância	Frequência do teste (aproximado)
Controlo de peso	100g	95,5g	Hora
	1Kg	985g	"
	5Kg	"

* De acordo com portaria n.º 1198/91 de 18 Dezembro

Características Químicas

Teste	tolerância
pH	5,6 ± 0,3
Humidade (%)	≤,5
Matéria gorda (%)	11 ± 1 %

Características Microbiológicas

Teste	Valor standard
Contagem total	<10.000 ufc/g
Contagem de Bacterias	<50 ufc/g
Contagem de Leveduras	<50 ufc/g
Contagem de Coliformes	<3 ufc/g
Pesquisa de E.Coli	Ausência /10g
Pesquisa de Salmonella	Ausência /25g
Pesquisa de Enterobacterias	Ausência /10g

Elaborado por: 

Data: 29/08/2006



CIMARRON

PRODUTOS ALIMENTARES

FRUTOGAL



Figura A I - Ficha técnica do produto cacau em pó Cimarron utilizado na aromatização do mel N.º 66 Beelove.

Anexo II



FICHA TÉCNICA

Flor de Sal com Flocos de Fava-do-mar (*Fucus vesiculosus*)

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTOR

nome: ALGAplus – Produção e comercialização de algas e seus derivados, Lda.
morada: CIEMar Ílhavo – Travessa Alexandre da Conceição s/n 3830-196 Ílhavo, Portugal
contactos: +351 234 092 496 geral@algaplus.pt

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO

produto: flor de sal de Aveiro enriquecida com flocos de macroalgas marinhas desidratadas.
marca: ALGAplus
composição por 100g: 9g de *Fucus vesiculosus*; 91g de flor de sal
apresentação do produto: balde de plástico com tampa selada. Com o tempo é normal que os flocos das algas percam coloração, sendo um processo perfeitamente natural, não comprometendo contudo a qualidade do produto.
origem: Portugal

CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO

Flor de sal da Ria de Aveiro, comercializada pela empresa SalTAlQual, Lda. Macroalgas colhidas de forma sustentável nos limites das instalações da ALGAplus e com certificação biológica.
processamento: desidratação a baixa temperatura até uma percentagem de humidade de 12%.

ANÁLISE DE QUALIDADE

Produto em conformidade com os limites estabelecidos para os parâmetros microbiológicos e toxicológicos alimentares. As análises são executadas por laboratório certificado.
GMO: nenhum.
Colorantes e conservantes: nenhum.

ALGAplus – Produção e comercialização de algas e seus derivados, Lda.
www.algaplus.pt | geral@algaplus.pt | +351 234 092 496



VALORES NUTRICIONAIS POR 100g DE *FUCUS VESICULOSUS*

parâmetros	valores médios	parâmetros	valores médios
Energia	422kj – 100,9kcal	Lípidos	1,3g
Água	9,5g	dos quais: saturados	0,21g
		polinsaturados	0,38g
Proteínas	7g	Fibra	46,5g
Hidratos de carbono	15,3g	Vitamina A	sem dados
dos quais: açúcares	sem dados	Polifenóis	3,2g
Vitamina B12	sem dados	Fósforo	130mg
Vitamina C	sem dados	Manganésio	8,7mg
Vitamina D	sem dados	Potássio	3420mg
Vitamina E	13,4mg	Cálcio	1730mg
Betacaroteno	sem dados	Ferro	13,7mg
Sal	9,9g	Zinco	8,4mg
Magnésio	880mg	Iodo	43600µg

Elaborado por CEVA (Centre d'Étude et de Valorisation des Algues), Fleublan, França - www.ceva.fr

CARACTERÍSTICAS DA EMBALAGEM

apresentação: embalagem certificada para utilização alimentar.

unidades de venda: 1kg

CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM E DISTRIBUIÇÃO

Em local fresco e seco, onde não se verifiquem mudanças bruscas de temperatura e exposição direta a raios solares. Após abertura, estas deverão ser muito bem fechadas para evitar a entrada de ar no interior das embalagens. A distribuição é realizada em veículos de caixa fechada.

ALGApplus – Produção e comercialização de algas e seus derivados, Lda.
www.algaplus.pt | geral@algaplus.pt | +351 234 092 496



Figura A II- Ficha técnica do produto flor de sal com flocos de fava-do-mar utilizado na aromatização do mel N.º 10 Seasalt.