



**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**

**BIOACTIVIDADE DO MEL: ACTIVIDADE
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E COMPOSIÇÃO
EM ÁCIDOS ORGÂNICOS**

Marina Filipa Paixão Domingos Lopes

MESTRADO EM BIOQUIMICA

2010



**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA**

**BIOACTIVIDADE DO MEL: ACTIVIDADE
ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E COMPOSIÇÃO
EM ÁCIDOS ORGÂNICOS**

**Marina Filipa Paixão Domingos Lopes
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

2010

**DISSERTAÇÃO DE TESE DE MESTRADO
ORIENTADA POR:
PROF. DOUTORA CÉLIA SILVA, DO CENTRO DE INVESTIGAÇÃO E TECNOLOGIA
AGRÁRIA DOS AÇORES (CITA-A) DA UNIVERSIDADE DOS AÇORES
PROF. DOUTORA AMÉLIA PILAR RAUTER DO "CARBOHYDRATE CHEMISTRY
GROUP" DO CENTRO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE DE LISBOA.**

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURA	VI
ÍNDICE DE QUADROS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJECTIVOS	3
1.2.1 <i>Objectivo Geral</i>	3
1.2.2 <i>Objectivo Específico</i>	3
CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO MEL	5
2.2 ABELHAS	6
2.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEL	7
2.3.1 <i>Água</i>	8
2.3.2 <i>pH</i>	9
2.3.3 <i>Cor</i>	9
2.3.4 <i>Glúcidos</i>	10
2.3.5 <i>Ácidos Orgânicos</i>	11
2.3.6 <i>Aminoácidos / Proteínas</i>	13
2.3.7 <i>Enzimas</i>	14
2.3.8 <i>Cinzas, Minerais e Vitaminas</i>	14
2.3.9 <i>Hidroximetilfurfural (HMF)</i>	15
2.3.10 <i>Compostos Fenólicos</i>	15
2.4 ANÁLISE POLÍNICA	17
2.4.1 <i>Flora dos Açores</i>	19
2.4.2 <i>Melissopalínologia</i>	20
2.5 PROPRIEDADES BIOACTIVAS DO MEL	21
2.5.1 <i>Actividade Antioxidante</i>	21
2.5.2 <i>Actividade Antimicrobiana</i>	23

CAPÍTULO III: MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 AMOSTRAS	26
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	27
3.2.1 <i>Determinação da Actividade da Água (a_w)</i>	27
3.2.2 <i>Determinação do pH</i>	27
3.2.3 <i>Determinação da Cor</i>	27
3.2.4 <i>Determinação dos Ácidos Orgânicos</i>	27
3.2.5 <i>Determinação do Índice de Fenol</i>	32
3.3 ANÁLISE POLÍNICA	33
3.4 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
3.4.1 <i>DPPH</i>	34
3.4.2 <i>Poder Antioxidante pela Redução de Ferro (FRAP)</i>	36
3.5 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA	37
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POLÍNICA DO MEL	40
4.1.1 <i>Actividade da Água (a_w)</i>	40
4.1.2 <i>pH</i>	41
4.1.3 <i>Cor</i>	42
4.1.4 <i>Ácidos Orgânicos</i>	43
4.1.5 <i>Índice de Fenol</i>	49
4.2 ANÁLISE POLÍNICA	51
4.3 ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	56
4.3.1 <i>DPPH</i>	56
4.3.2 <i>Poder Antioxidante pela Redução de Ferro (FRAP)</i>	57
4.4 ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	60
4.4.1 <i>Efeito da Diluição</i>	60
4.4.2 <i>Efeito da Catalase - Actividade Antimicrobiana Não Peroxidásica</i>	61
4.4.3 <i>Efeito da Neutralização do pH</i>	63
4.5 ANÁLISE MULTIVARIADA	64
CAPÍTULO V: CONCLUSÃO	75
CAPÍTULO VI: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO I: REGRESSÃO LINEAR MULTIVARIADA	90
ANEXO II: ANÁLISE POLÍNICA	96
ANEXO III: ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA	99

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Começo por agradecer à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e ao Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores, mais propriamente ao CITA-A, por ter sido a minha instituição de acolhimento para a realização deste mestrado.

Ao meu grupo de trabalho Tecnologia Alimentar, do qual me orgulho em fazer parte.

Um agradecimento especial á minha orientadora Prof. Doutora Célia Silva que acreditou e mim. Pelo seu respeito, carinho e paciência com que orientou o meu trabalho, por estar sempre disponível para ouvir as minhas dúvidas existenciais, pela liberdade de acção que me permitiu e pelo espírito positivo, bastante importante nas complicadas alturas do trabalho e da vida. Principalmente pela sua amizade com a qual eu sei que poderei contar sempre.

Também um forte agradecimento à minha co-orientadora Prof. Doutora Amélia Pilar Rauter pelos conselhos sempre úteis e sábios, tanto profissionais.

Ao Professor Airidas pela disponibilidade e ensinamentos ao nível do HPLC e pela sua amizade.

Ao Professor Fernando Antunes, que muito me ajudou para aprovação no mestrado.

Á Prof. Doutora Maria de Lurdes Enes pela sua orientação na área da microbiologia e pela sua disponibilidade.

Ao Professor Paulo Borges pela sua ajuda preciosa na análise estatística.

Á Andreia pela ajuda na parte das análises microbiológicas.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia, Sandra Câmara, Berta e Dona Guida, pela boa disposição e pelo bom ambiente de trabalho proporcionado.

Ao meu querido e grande amigo, Nuno Barata, que me ajudou em toda a parte logística do mestrado e sem a qual não era possível a sua realização. Mas acima de tudo pela sua amizade e apoio incondicional.

À minha família, especialmente ao meu marido João, pelos momentos que deixei de estar com ele para me dedicar à investigação e á tese, por acreditar em mim e em tudo o que faço, pela sua força e energia que me contaminam diariamente e me dão vontade de ir à luta, pelos seus conselhos e por me convencer que sou capaz de tudo o que eu quiser.

RESUMO

O mel tem sido alvo de vários estudos sobre a sua composição e propriedades, indicando que alguns méis de diferentes origens possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes específicas, que variam de acordo com a sua origem floral. Os Açores com a sua flora endémica são propícios para a produção de mel. No entanto, existem poucos estudos que caracterizam os méis açorianos. Deste modo, foram analisadas 27 amostras de mel de diferentes ilhas dos Açores, de Portugal continental, Austrália, Argentina e Nova Zelândia, avaliando-se a sua composição em fenóis totais e avaliando-se a actividade antioxidante através do método de avaliação da capacidade de captação de radicais (DPPH) e do poder antioxidante pela redução de ferro (FRAP). Foram avaliados a actividade da água (a_w), pH e cor, e analisados os ácidos orgânicos (fórmico, D-málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico e fumárico) por cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) e o ácido glucónico total (ácido D-glucónico livre e D-glucono- δ -lactona) por um Kit enzimático da Boehringer. Foi ainda avaliada a actividade antimicrobiana contra duas estirpes de *Staphylococcus aureus* (3DA e 2LaQ) pelo método por difusão em agar ("well-assay test") e realizada a análise polínica através da contagem dos grãos de pólen dos méis por microscopia óptica. Efectuaram-se regressões lineares múltiplas entre a análise polínica e o pH, a_w , fenóis e ácidos cítrico e glucónico. De forma a identificar os grupos em cada região relacionados com o conteúdo em ácidos orgânicos e com a sua identificação polínica, foi realizada análise de *clusters* e de componente principal (PCA).

Observou-se que os méis Açorianos possuíam um pH mais baixo (entre 3,4 e 3,5), quando comparados com méis provenientes de outras regiões (entre 4,0 e 4,2). Através da regressão linear multivariada detectaram-se os ácidos orgânicos (láctico, acético, fórmico e D-málico) que mais influenciam os valores de pH ($R^2 = 0,764$).

Os méis que apresentaram coloração mais escura foram os da Nova Zelândia, Trás-os-Montes e Serra do Caramulo, sendo os mais claros provenientes da Ilha Terceira, Pico, Algarve e Alentejo. Encontrou-se uma correlação significativa entre a coloração dos méis e o seu conteúdo em fenóis ($R^2 = 0,500$, $p < 0,001$).

Observou-se uma variação acentuada da actividade antioxidante nas amostras de mel analisadas, variando entre $4,77 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq}/\text{mg}$ (Alentejo) e $49,12 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq}/\text{mg}$ (Trás-os-Montes), para o DPPH e entre 62,74 μM (Alentejo) e 544,78 μM (Serra do Caramulo), para o FRAP. Os méis que apresentaram maior actividade antioxidante foram os méis provenientes de Trás-os-Montes e Serra do Caramulo, ambos com pólenes dominantes da família

Ericaceae (Urze e Azálea), a menor actividade antioxidante foi apresentada pelo mel do Alentejo (monofloral de soagem). Verificou-se uma correlação elevada entre o conteúdo em fenóis e a actividade antioxidante dos méis ($R^2 = 0,7309$, para o DPPH e $R^2 = 0,7891$, para o FRAP), demonstrando assim o papel dos fenóis na actividade antioxidante. Através da análise multivariada, as amostras de Trás-os-Montes, Serra do Caramulo e Nova Zelândia foram agrupadas devido à sua cor, teor em fenóis e actividade antioxidante (FRAP e DPPH).

Foram identificados 83 tipos polínicos, nos quais se destacam-se 12 géneros polínicos que aparecem em maior percentagem das amostras analisadas, *Pittosporum* (Incenso - 94 %), *Eucalyptus* (89 %), não identificada (83 %), *Trifolium* (Trevo - 83 %), *Castanea* (78 %), *Rubus* (56 %), *Poaceae* (56 %), *Eriobotrya* (Nespereira - 50 %), *Helianthus* (50 %), *Ligustrum* (44 %), *Erica* (Urze - 44 %) e *Tibouchina* (Quaresmeira - 39 %).

Observaram-se semelhanças nas espécies polínicas e composição em ácidos orgânicos, entre algumas amostras de mel provenientes da ilha Terceira e da Nova Zelândia. As amostras de mel provenientes da região Norte de Portugal Continental (Trás-os-Montes e Serra do Caramulo) apresentaram valores significativamente mais elevados ($p < 0,05$) de ácido láctico, fumárico e glucónico. Este último pode estar relacionado com a actividade antimicrobiana do mel, devido à acção do glucose oxidase. Dos ácidos orgânicos estudados, os que melhor contribuíram para a caracterização dos méis foram os ácidos cítrico e glucónico, identificando-se respectivamente duas origens botânicas (*Pittosporum* e *Erica*).

A actividade antimicrobiana detectada nas amostras de mel variou segundo a estirpe de *S. aureus* estudada. A estirpe de referência (2LaQ) mostrou uma maior sensibilidade às amostras de mel estudadas. Algumas amostras continuaram a apresentar actividade antimicrobiana após diluição a 25% e neutralização do pH. Observaram-se valores elevados de actividade antimicrobiana não peroxidásica (independente do H_2O_2), na estirpe de referência (2LaQ) em cinco amostras dos Açores (Terceira e São Miguel) e duas do Continente Português (Serra do Caramulo e Trás-os-Montes).

PALAVRAS-CHAVE:

- Mel
- Ácidos orgânicos
- Melissopalinologia
- Actividade antioxidante
- Actividade antimicrobiana

ABSTRACT

Several studies about the composition and properties of honey indicated that honey from different floral sources have specific antimicrobial and antioxidant properties resulting from floral origin. The Azores, with its endemic flora, is a suitable place for honey production, yet few studies are available about Azorean honey characterization. In the present study, 27 samples of honey from different Azorean islands, Portugal mainland, Australia, Argentine and New Zealand were analysed. Total phenol content was measured and antioxidant activity was determined by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) radical scavenging method and the ferric reducing antioxidant power (FRAP). Water activity (a_w), pH and color were also measured. Organic acids (formic, D-malic, lactic, acetic, maleic, citric, succinic and fumaric acids) were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and the total D-gluconic acid (free D-gluconic acid and D-glucono- δ -lactone) was determined using Boehringer enzymatic kit. In addition, the antimicrobial activity against two strains of *Staphylococcus aureus* (3DA e 2LaQ) was measured in an agar diffusion well-assay test and pollinic analysis was performed by pollen identification and count using optic microscopy. Multiple linear regression was performed between pollen analysis and pH, a_w , phenol content, citric acid and total gluconic acid. In order to identify patterns in organic acids and pollen content of honey from each region, cluster analysis and principal components analysis (PCA) were made.

Azorean honeys had a lower pH (between 3.4 and 3.5) when compared to honey from other regions (ranged from 4.0 and 4.2). This lower pH was influenced by organic acids (lactic, acetic, formic and D-malic acids) specified by multiple linear regression analysis ($R^2 = 0,764$).

The darker honeys came from New Zealand and the North of Portugal (Trás-os-Montes and Serra do Caramulo), and the lighter honeys were originated from Azores islands (Terceira and Pico) and the South of Portugal (Algarve and Alentejo). A significant correlation was found between honey colour and total phenol content ($R^2 = 0,500$, $p < 0,001$).

A large variation in antioxidant activity was found in honey studied, ranging from $4,77 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq}/\text{mg}$ (Alentejo) to $49,12 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq}/\text{mg}$ (Trás-os Montes) in DPPH assay and from $62,74$ μM (Alentejo) to $544,78$ μM (Serra do Caramulo) in the FRAP assay. The samples from Trás-os Montes and Serra do Caramulo, with predominant pollen from *Ericaceae* family (Urze and Azalea), presented the highest antioxidant activity, while the lowest antioxidant activity was found in Alentejo honey (*Echium* spp. unifloral). A high correlation was found

between total phenol content and antioxidant activity ($R^2 = 0,7309$ for the DPPH assay and $R^2 = 0,7891$ for the FRAP assay), indicative of the importance of phenols in the antioxidant activity of honey. Data from multivariate analysis grouped honey samples from Trás-os-Montes, Serra do Caramulo and New Zealand accounting for colour, total phenol content and antioxidant activity (FRAP and DPPH).

Eighty-three pollen types were identified and twelve pollen genus were most represented: *Pittosporum* (Incense - 94 %), *Eucalyptus* (89 %), not identified (83 %), *Trifolium* (clover - 83 %), *Castanea* (78 %), *Rubus* (56 %), Poaceae (56 %), *Eriobotrya* (50 %), *Helianthus* (50 %), *Ligustrum* (44 %), *Erica* (44 %) e *Tibouchina* (39 %).

Some samples originated from Terceira Island and New Zealand had identical pollen and organic acid composition. Honey produced in the North of Portugal (Trás-os-Montes e Serra do Caramulo) had a higher content of lactic, fumaric and gluconic acids ($p < 0,05$). The latest may be related with antimicrobial activity of honey, due to the glucose oxidase activity. The organic acids that most contributed to the honey characterization were the citric and gluconic acids and these are related to two botanical origins (*Pittosporum* e *Erica*).

Antimicrobial activity of different honey samples differed among the two *S. aureus* strains studied. Reference strain (2LaQ) was more sensitive to antimicrobial activity of honey. Some honey samples maintain antimicrobial activity after 25% dilution and pH neutralization. High values of nonperoxide antimicrobial activity of honey (H_2O_2 independent) against the reference strain (2LaQ) were found in five samples from the Azores (Terceira and São Miguel) and two samples from Mainland Portugal (Serra do Caramulo and Trás-os-Montes).

KEYWORDS:

- Honey
- Organic acids
- Melissopalynology
- Antioxidant activity
- Antimicrobial activity

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Potes de mel de <i>Apis mellifera</i> , ilustrando a variedade de cores, considerando as diversas fontes florais que o originaram	5
Figura 2 - Abelhas do género <i>Apis mellifera</i> encontrada nos Açores	6
Figura 3 - Estrutura química de alguns ácidos orgânicos.....	12
Figura 4 - Estrutura de um fenol	16
Figura 5 – Esquemas de grãos de pólen de diferentes origens botânicas	18
Figura 6 - <i>Pittosporum undulatum</i>	19
Figura 7 – Curva de calibração dos ácidos fórmico, D-Málico, Láctico, Acético, Maleico, Cítrico, Succínico e Fumárico*	30
Figura 8 – Cromatogramas representativos: A) Mistura de soluções padrão dos ácidos orgânicos analisados (ácido fórmico, D-málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico e fumárico); B) Amostra de mel da Ilha Terceira	29
Figura 9 – Curva de calibração do ácido Gálico, para determinação do índice de fenol	33
Figura 10 - Demosntração da estabilização do radical livre DPPH a) Radical Livre DPPH b) Forma não radical do DPPH.....	35
Figura 11 - Curva Calibração do ácido ascórbico, para determinação do DPPH	35
Figura 12 - Curva Calibração de FeSO ₄ .7H ₂ O, para determinação do FRAP.....	36
Figura 13 - Medição dos halos de inibição.....	38
Figura 14 - Curvas padrão de fenol utilizadas para avaliar a actividade antimicrobiana do mel, para as duas estirpes estudadas, 3DA e 2LaQ.....	38
Figura 15 - Correlação entre a cor e o conteúdo em fenol das amostras de mel analisadas	51
Figura 16 - Representação da percentagem de géneros polínicos, mais abundantes, nas amostras analisadas. NI - Não Identificado	52
Figura 17 - Percentagem da frequência dos tipos plínicos identificados na amostra de mel monoflorais (Alentejo)	53
Figura 18 - Percentagem da frequência dos tipos plínicos identificados na amostra de mel Multiflorais (Mel dos Açores (3) da Ilha Terceira)	53
Figura 19 - Correlação entre o teor total de fenóis e a actividade antioxidante das amostras de mel. A: DPPH; B: FRAP	58
Figura 20 - Correlação entre a cor e a actividade antioxidante das amostras de mel. A: DPPH; B: FRAP	59
Figura 21 - Inibição do crescimento das duas estirpes de <i>S. aureus</i> , 3DA e 2LaQ.....	60
Figura 22 - Efeito da diluição, neutralização do pH e adição de catalase às soluções diluídas de mel a 25% e 50%, sobre a actividade antibacteriana nos méis estudados contra o <i>S. aureus</i> 3DA	62
Figura 23 - Efeito da diluição, neutralização do pH e adição de catalase às soluções diluídas de mel a 25% e 50%,sobre a actividade antibacteriana nos méis estudados contra o <i>S. aureus</i> 2LaQ	62

Figura 24 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para as variáveis físico-químicas estudadas	64
Figura 25 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa à variáveis originais (pH, cor, aw, fenóis, FRAP, DPPH e ácidos fórmico, D-málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico e fumárico). A primeira componente (C1) explica 28,82% da variância total e a segunda componente (C2) explica 18,5% da variância total	66
Figura 26 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para a análise polínica	66
Figura 27 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa à variáveis originais (análise polínica). A primeira componente (C1) explica 21,78% da variância total e a segunda componente (C2) explica 16,51% da variância total	67
Figura 28 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para os ácidos orgânicos estudados.....	68
Figura 29 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa à variáveis originais (ácidos fórmico, D-málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico e fumárico). A primeira componente (C1) explica 64,51% da variância total e a segunda componente (C2) explica 18,18% da variância total	69
Figura 30 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para as variáveis físico-químicas (pH, cor, a _w) e actividade antioxidante (fenóis, DPPH e FRAP).....	70
Figura 31 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa à variáveis originais (pH, cor, aw, fenóis, FRAP, DPPH). A primeira componente (C1) explica 28,82% da variância total e a segunda componente (C2) explica 18,5% da variância total	71
Figura 32 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para a estirpe de <i>S.aureus</i> 2LaQ	72
Figura 33 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa à variáveis originais (<i>S. aureus</i> 2LaQ). A primeira componente (C1) explica 92,53% da variância total e a segunda componente (C2) explica 3,92% da variância total	72
Figura 34 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para a estirpe de <i>S.aureus</i> 3DA.....	73
Figura 35 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa à variáveis originais (<i>S. aureus</i> 3DA). A primeira componente (C1) explica 56,74% da variância total e a segunda componente (C2) explica 26,74% da variância total	74

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Composição química do mel.....	11
Quadro 2 - Plantas de interesse apícola nos Açores	19
Quadro 3 - Nome e origem das amostras de mel analisadas.....	26
Quadro 4 – Tempos de retenção dos ácidos orgânicos analisados. Os valores indicados representam a média ± SEM de três determinações	28
Quadro 5 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para a a_w . Os valores indicados representam a média±SEM, de três determinações	40
Quadro 6 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores de pH	42
Quadro 7 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel analisadas e respectivos valores obtidos para a cor. Os valores indicados representam a média ± SEM de três determinações.....	43
Quadro 8 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para os ácidos orgânicos. Os valores indicados representam a média de três determinações. nd - não determinado	44
Quadro 9 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para os ácidos orgânicos. Foram analisadas 27 amostras.....	47
Quadro 10 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores do conteúdo de fenois. Os valores indicados representam a média ± SEM.....	49
Quadro 11 - Identificação da origem geográfica, classificação e índice de dominância (D) das amostras de mel analisadas	51
Quadro 12 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para o DPPH. Os valores indicados representam a média ± SEM de três determinações.....	56
Quadro 13 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para o FRAP. Os valores indicados representam a média ± SEM de três determinações.....	58
Quadro 14 - Estimativa das variâncias e percentagem acumulada da variação total (%) obtidas através da PCA, das 27 amostras analisadas e 15 parâmetros físico-químicos.....	64
Quadro 15 - Estimativa das variâncias e percentagem acumulada da variação total (%) obtidas através da PCA, das 18 amostras analisadas e 83 tipos polínicos.....	68
Quadro 16 – Efeito da diluição (10%, 25%, 30%, 50%), da neutralização (25% e 50%) e da adição de catalase (25% e 50%) sobre a actividade antimicrobiana de vários méis contra o <i>Staphylococcus</i> 3DA. Os valores representam a média ± SEM de 4 determinações.....	99
Quadro 17 – Efeito da diluição (10%, 25%, 30%, 50%), da neutralização (25% e 50%) e da adição de catalase (25% e 50%) sobre a actividade antimicrobiana de vários méis contra o <i>Staphylococcus</i> 2LaQ. Os valores representam a média ± SEM de 4 determinações.....	100

LISTA ABREVIATURAS

Jr. - Júnior	LDL - lipoproteína de baixa densidade
ton - Toneladas	<i>E. coli</i> - <i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	mmol/L - milimol por litro
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila	UMF - Unique Manuka Factor
FRAP - Poder Antioxidante pela Redução de Ferro	GO - Glioxal
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão	MGO - Metilglioxal
UV - Ultra Violeta	3-DG - 3-deoxiglucose
HMF - Hidroximetilfurfural	mAU - mili unidades de absorvência
SPME - Solid Phase Microextraction	mL/min - mililitro por minuto
GC-MS - Cromatografia Gasosa - Espectrofotometria de Massa	µL - microlitro
a_w - actividade da água	H ₂ SO ₄ - Ácido sulfúrico
meq/kg - miliequivalente por kilograma	NaOH - Hidróxido de sódio
g - grama	SPE - Extração de fase sólida
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato	HCl - Ácido clorídrico
KOH - hidróxido de potássio	ATP - Trifosfato de adenosina
nm - nanómetro	6-PGDH - 6-fosfogluconato desidrogenase
mg/kg - miligrama por kilograma	Na ₂ CO ₃ - Carbonato de sódio
GC - cromatografia gasosa	GAE - Equivalente de ácido gálico
H ₂ O ₂ - Peróxido de hidrogénio	Fe ³⁺ -TPTZ - Complexo ferro-2,4,6-tripiridil-s-triazina
km - quilómetro	TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina
µm - micrómetro	FeSO ₄ .7H ₂ O - Sulfato ferroso
ROS - Espécies reactivas de oxigénio	FeCl ₃ .6H ₂ O - Cloreto de ferro
BHA - Butilhidroxianisol	BHI - Brain Heart Infusion
BHT - Butilhidroxitolueno	UFC/ml - Unidades formadoras de colónia por mililitro
PG - propilgalato	CAP4 - Community Analysis Package 4
TBHT - <i>tert</i> -butilhidroquinona	PCA - Análise ao componente principal
ORAC - Oxygen radical absorbance capacity	S.E.M. - Erro Padrão da média
CUPRAC - Cupric reducing antioxidant capacity	SPSS - Statistical Package for the Social Science
TBARS - Thiobarbituric acid reactive substances	NI - Não identificado

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

O mel foi desde sempre considerado pelo Homem um produto especial, sendo utilizado como alimento de alta qualidade, rico em energia ou como agente terapêutico.

A apicultura nasceu nos Açores por volta do Século XVI. Esta actividade destaca-se por ter benefícios a nível social, económico e ecológico, e nos Açores é tradicionalmente praticada para auto consumo ou como fonte extra de rendimento. No entanto, esta actividade encontra-se em expansão, nos Açores, devido às suas condições climatéricas e solo fértil, que são propícias para o desenvolvimento e reprodução de uma flora abundante, rica e diversificada. A sua riqueza vegetal, distinta pelas suas espécies endémicas, a ausência de doenças nas abelhas e o seu clima, facultam o desenvolvimento de uma apicultura insular com características própria e de elevada qualidade.

Existe produção de mel em todas as ilhas, no entanto esta é mais acentuada nas Ilhas do Pico, S. Miguel e Terceira. Nos Açores existem cerca de 255 apicultores, 424 apiários, 3850 colmeias, e 169 cortiços/núcleos. Na ilha terceira existem 69 apicultores (18 dos quais associados à Fruter/Frutercoop), 94 apiários, 892 colmeias (das quais 576 associados à Fruter/Frutercoop) e 31 cortiços/núcleos, sendo produzido cerca de 4500 kg de mel e cerca de 1000 kg do "Mel dos Açores" (Direcção Regional do Desenvolvimento Agrário).

O "Mel dos Açores" é reconhecido como denominação de origem ⁽¹⁾ desde 1994. Desta forma, é necessário prevenir as fraudes, procedendo à caracterização do mel do ponto de vista polínico para confirmação das denominações atribuídas, nos Açores o "Mel de Incenso" e o "Mel Multiflora".

O preço e qualidade do mel estão relacionados com a origem floral que lhe deu origem, bem como com a sua composição química, uma vez que este é obtido pela desidratação e transformação do néctar de uma determinada planta, que varia com a sua produção e concentração de néctar que foi retirado e secretado pelas flores circundantes das colmeias (Crane, 1990). No entanto, a composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar que lhe deu origem, enquanto as condições climatéricas

(1) Nos termos do regulamento (CEE) 1107/96, da comissão de 12 de Julho, o "Mel dos Açores" foi registado como denominação de origem protegida, beneficiando a partir dessa data de protecção comunitária atribuída nos termos do regulamento (CEE) 2081/92, de 14 de Julho.

(temperatura e humidade) e o manuseio do apicultor apresenta uma menor influência (White Jr., 1978). Desta forma, a análise polínica tornou-se uma ferramenta eficaz na caracterização do mel, bem como da área de cobertura pelas abelhas, visto que estas procuram néctar e pólen num raio de 3 km (Madejczyk and Baralkiewicz, 2008).

A certificação da origem floral através da identificação no mel de compostos químicos característicos de determinadas espécies florais pode apresentar vantagens significativas em relação à análise polínica actualmente utilizada. Por outro lado, a quantificação de compostos antioxidantes no mel pode conduzir a uma valorização do produto junto do consumidor em virtude do seu uso tradicional como adoçante poder constituir uma alternativa mais saudável. A existência destas propriedades pode ainda favorecer a utilização do mel como conservante alimentar natural, sendo já conhecida a sua acção inibidora sobre a reacção que provoca o escurecimento de alimentos.

A caracterização físico-química dos méis é importante e primordial para garantir a qualidade do produto no mercado, pelo que têm sido efectuados esforços no sentido de desenvolver metodologias científicas que podem ser utilizadas para identificar as fontes vegetais a partir das quais se produz mel. Além disso, com o interesse internacional de caracterizar o mel, a investigação em torno deste produto tem vindo a aumentar e têm surgido vários estudos sobre a sua composição e propriedades, indicando que alguns méis de diferentes origens possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes específicos.

O mel possui ácidos orgânicos naturais, que variam em concentração de acordo com a sua origem. Está descrito na literatura que os ácidos orgânicos constituem cerca de 0,5% dos sólidos constituintes do mel, e que são responsáveis pelo seu sabor e capacidade antimicrobiana (Suárez-Luque *et al.*, 2002a e b). Até à data foram identificados 19 ácidos orgânicos no mel que poderão servir para diferenciar os vários tipos de méis (Crane, 1990). Durante muito tempo pensou-se que o ácido cítrico predominava no mel, com pequenas concentrações de ácido fórmico, acético, butírico, málico e succínico (Nelson and Mottern, 1931). No entanto, Stinson *et al.* (1960) determinou que o ácido glucónico era predominante no mel, podendo também encontrar-se os ácidos láctico, oxálico, pirúvico, maleico, cítrico, fórmico, acético, butírico, málico, succínico e fumárico (Nelson and Mottern, 1931). A concentração de alguns ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico pode ser um indicador de diferenciação entre os tipos de méis. O ácido glucónico está relacionado com as reacções enzimáticas que ocorrem durante o processo de amadurecimento, pelo que o seu equilíbrio com a glucolactona é originado basicamente pela actividade do glucose oxidase, que é acrescentado na maturação do mel pela abelha, com alguma contribuição da acção bacteriana. A reacção do glucose oxidase também produz peróxido de hidrogénio, que é a principal fonte da acção antimicrobiana no mel. O sabor do mel é afectado basicamente pelo ácido fórmico e em menores quantidades pelo ácido láctico e oxálico,

sendo que os méis com menor aroma (acácia) possuem menores quantidades de ácidos do que os méis mais aromáticos (Ruiz-Argüeso and Rodríguez-Navarro, 1973; Bogdanov *et al.*, 1999).

Contudo existe muito pouca informação disponível acerca dos ácidos orgânicos e da sua análise, pelo que este estudo pretende determinar quais os ácidos orgânicos que existem em maiores quantidades nos méis Açorianos e compará-los com méis de outras regiões. Os resultados da investigação dão a conhecer a importância relativa dos ácidos orgânicos na actividade antioxidante e antimicrobiana do mel. A determinação destes ácidos é o objectivo central do estudo, uma vez que estes poderão elucidar sobre a actividade antioxidante/antimicrobiana dos méis.

1.2 OBJECTIVOS

1.2.1 Objectivo Geral

Nos Açores a apicultura está bem implantada, sendo produzido cerca de 97 toneladas de mel na região: 5,16 toneladas (ton) em Santa Maria; 37,48 ton em São Miguel; 19,44 ton na Terceira; 2,16 ton na Graciosa; 3.84 ton em São Jorge; 24,60 ton no Pico e 3,68 ton nas Flores (Marques, 1996).

O mel açoriano apresenta uma possibilidade no controlo das infecções antimicrobianas contra o *Staphylococcus aureus*.

O objectivo geral deste trabalho é determinar a variabilidade composicional de amostras de mel de diferentes ilhas dos Açores e de várias regiões da mesma ilha onde a origem floral e tipo de abelhas sejam diferentes, avaliar os parâmetros físico-químicos, a actividade antioxidante, antimicrobiana e composição em ácidos orgânicos e comparar com a flora que lhe deu origem por métodos cromatográficos e espectrofotométricos.

1.2.2 Objectivo Específico

Os objectivos específicos consistem na realização de um estudo comparativo de várias amostras de mel de diferentes localizações tendo em conta:

- (1) Determinar a actividade antioxidante:
 - Composição de fenóis totais;
 - DPPH;
 - FRAP;
- (2) Determinar a actividade antimicrobiana contra organismos:
 - Verificar a actividade antimicrobiana de amostras de mel contra o *S.aureus*

- Estudar o efeito da diluição, neutralização e adição de catalase sobre a eficiência do mel
- (3) Avaliar a qualidade dos méis por parâmetros físico-químicos:
- a_w ;
 - pH;
 - Cor;
- (4) Determinar alguns dos ácidos orgânicos utilizando:
- Técnicas de cromatografia de HPLC (Ácidos Fórmico, D-málico, Láctico, Acético, Cítrico, Maleico, Succínico e Fumárico);
 - Espectrofotometria UV por testes enzimáticos (Ácido Glucónico);
- (5) Identificação polínica das amostras de mel;
- (6) Estabelecer a origem botânica dos méis, considerando os resultados da análise polínica.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO MEL

O mel é uma substância viscosa, aromática e açucarada obtido pelo processamento das abelhas *Apis mellifera* a partir do néctar de várias plantas. Deste modo, a fonte de néctar que lhe deu origem e a espécie de abelha conferem ao mel o seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e as suas propriedades medicinais. Este produto natural é a maior fonte concentrada de açúcares existente (FAO, 1996) e é utilizado como conservante alimentar (Ferreira *et al.*, 2009).



Figura 1 - Potes de mel de *Apis mellifera*, ilustrando a variedade de tons, considerando as diversas fontes florais que o originaram.

O mel tem sido utilizado como alimento pelo Homem desde os tempos pré-históricos, que o retiravam dos enxames, causando danos no meio ambiente e por vezes matando as abelhas. No entanto, o Homem foi aprendendo a proteger os enxames, a instalá-los em colmeias e a manejá-los para que houvesse uma maior produção de mel sem causar danos às abelhas, nascendo assim, a apicultura (Crane, 1983).

A apicultura foi tomando forma ao longo dos tempos, ganhando o mundo e tornando-se uma fonte importante de rendimento para diversas famílias, tendo-se ainda desenvolvido a exploração de outros produtos provenientes das abelhas, tais como o pólen apícola, a geleia real, as rainhas, a polinização, a apitoxina e a cera.

A classificação do mel depende da fonte de néctar. Assim, este pode ser classificado de monofloral, quando a maior parte do néctar é recolhido de uma única espécie floral; polifloral ou multifloral, quando mais do que uma espécie floral contribui com o seu néctar; e silvestre quando produzido por espécies nativas. A caracterização dos méis florais pode ser

efectuada pela análise microscópica, que possibilita a identificação e quantificação dos grãos de pólen (Vargas, 2006).

Um dos méis monoflorais mais comercializados na região dos Açores é o “ Mel de Incenso“. Este tem uma cor variável entre incolor e amarelado, odor delicado e perfumado, consistência fluida e um sabor muito doce e típico, produzido essencialmente em zonas de baixa e média altitude, ocupando matas densas, grutas e sebes de protecção. O mel multifloral tem cor castanho-escura, sabor agradável e consistência fluida, produzindo-se em zonas de baixa e média altitude, ocupando pomares, sebes e parques florestais. Estes dois tipos de mel foram reconhecidos pelas suas características específicas com o Selo de Denominação de Origem – Mel dos Açores.

2.2 ABELHAS

As abelhas existem no nosso planeta há 40 milhões de anos, tendo emergido na sequência do desenvolvimento floral. Existe uma relação simbiótica recíproca entre as abelhas e a flora, visto que é nesta que as abelhas encontram o néctar e o pólen indispensável à sua sobrevivência, mas por sua vez, parte do pólen fica retido no corpo das abelhas que o transporta para diversas regiões onde irá fecundar outra flor, promovendo a polinização cruzada (Adelmann, 2005).

As abelhas são dos insectos polinizadores as mais eficientes, sendo de vital importância para o meio ambiente devido à garantia de perpetuação das espécies vegetais (Adelmann, 2005).

As abelhas do género *Apis mellifera* (Figura 2) são as mais utilizadas na produção de mel na Europa, África e Médio Oriente, juntamente com as subespécies *carnica*, *remipes* (abelha caucásica), *lingustica* e *aurea* (abelhas italianas) e *adansonni* (abelha africana), *Apis cerana* (nativa do sul da Ásia), *Apis dorsata* e *Apis florea* (nativas dos trópicos da Ásia). Também existem as abelhas de ferrão (meliponídeos dos trópicos de todos os continentes), espécies de vespas na América do Sul e formigas nas zonas secas da Austrália e América do Norte que também produzem mel (Crane, 1983, 2004).



Figura 2 - Abelhas do género *Apis mellifera* encontrada nos Açores.

Cada colmeia acarreta cerca de 80 000 abelhas, sendo a maioria operárias, que realizam todo o trabalho de manutenção da colmeia e de acordo com a idade e das necessidades da colmeia, 1 rainha, que tem como função a produção dos ovos e a manutenção da ordem social na colmeia e cerca de 0 a 400 zangões, que são os machos da colónia cuja função é fecundar a rainha durante o voo nupcial (Pereira *et al.*, 2003).

2.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEL

O mel é um composto líquido constituído por cerca de 200 substâncias que variam consoante a fonte floral que lhe dá origem, estação do ano, factores ambientais, manuseamento e processamento (Ferreira *et al.*, 2009; White, 1979, Gheldof *et al.*, 2002; Anklam, 1998; Al-Mamary *et al.*, 2002; Azeredo *et al.*, 2003; Küçük *et al.*, 2007).

Os métodos físico-químicos utilizados para fins de caracterização do mel tornaram-se de elevada importância nos últimos anos. Vários países já desenvolveram estudos neste sentido, desancando-se: a Arábia Saudita, a Argentina, o Brasil, o Canadá, a China, o Egipto, a Espanha, a Grécia, a Itália, o Paraguai, o Uruguai, a Venezuela, Portugal, entre outros.

Os principais constituintes do mel são os glicídios, seguidos dos minerais, proteínas, vitaminas, lípidos, ácidos orgânicos, aminoácidos (Finola *et al.*, 2007), compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), enzimas, outros fitoquímicos (Bertoncelj *et al.*, 2007), água e de pequenas quantidade de outras substâncias, algumas das quais responsáveis pela actividade antioxidante do mel. Estas substâncias são os ácidos fenólicos e flavonóides (Ferrerres *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 1997), enzimas (invertase, glucose oxidase, amilase e catalase), ácido ascórbico (White, 1975), ácidos orgânicos (Cherchi *et al.*, 1994), produtos da reacção de *Maillard* (White, 1975), aminoácidos e proteínas (White and Rudyj, 1978), ceras, óleos voláteis, éteres, gomas e minerais. O mel também contém grãos de pólen (de 100 a 5000 / g de mel), que são indicadores da origem botânica e geográfica do mel (Gheldof and Engeseth, 2002).

Os requisitos físico-químicos do mel foram estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, no Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro, onde não é permitido a adição de açúcares e/ou substâncias que alterem o mel original. No entanto, o mel pode apresentar tonalidades diferentes, desde incolor a castanho muito escuro, aromas e sabores variados que dependem da sua origem.

A identificação e qualidade do mel deverão ser determinadas de acordo com os requisitos mínimos de qualidade físico-química dos méis florais, a qual consiste nos parâmetros indicativos de maturidade (análise de açúcares redutores, humidade e sacarose), de pureza (sólidos insolúveis em água e minerais - cinzas) e de deterioração

(teores de acidez livre, hidroximetilfurfural - HMF e actividade diastásica). Outros factores que devem ser contabilizados são os valores de pH, proteínas, índice de formol, condutividade eléctrica e cor.

A caracterização físico-química dos méis é importante e primordial para garantir a qualidade do produto no mercado, pelo que têm sido efectuados esforços no sentido de desenvolver metodologias científicas que podem ser utilizadas para identificar as fontes vegetais a partir das quais se produz mel.

Bogdanov *et al.* (2004) fizeram uma revisão sobre os métodos físico-químicos que permitiam uma caracterização dos méis monoflorais e que são utilizados em análises de rotina no controlo de qualidade, tais como, análises dos parâmetros físico-químicos de rotina (condutividade eléctrica, açúcares, razão fructose/glucose, actividade enzimática, prolina, cor, pH e acidez), determinação de polifenóis por HPLC, determinação de compostos voláteis por "Solid Phase Microextraction" (SPME), por Cromatografia Gasosa - Espectrofotometria de Massa (GC-MS) e espectrofotometria de infra-vermelhos. No entanto, e uma vez que certos métodos dependem de pessoas especializadas e de várias etapas, tem sido frequente utilizar apenas um método analítico para determinar a origem botânica.

Num estudo para isolar os compostos voláteis em amostras de mel de eucalipto e laranjeira colhidas no Brasil, Bastos *et al.* (2002) utilizaram a cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massa. Neste estudo identificaram no mel de laranjeira o benzaldeído, o óxido *cis* de linalol, *n*-heptanal, 6-metil-5-hepten-2-ona, o octanal e o fenilacetaldéido; e em méis de eucalipto identificaram o nonanal, o 2-heptanona, o 2-heptanol, o octanal e o nonanol. De todos os compostos analisados, o nonanal e o nonanol apresentaram uma importante contribuição sensorial nos méis de eucalipto, enquanto o fenilacetaldéido e o benzaldeído eram os principais descritores do mel de laranjeira.

2.3.1 Água

A água é o segundo componente em quantidade no mel (15 a 20%, segundo o Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro da legislação portuguesa), e pode ser influenciada pela origem floral e geográfica, pelas condições climáticas e pela colheita do mel antes da sua maturação. A humidade pode influenciar a viscosidade, maturação, cristalização, sabor e conservação do mel, bem como determinar a qualidade do produto (Abramovic *et al.*, 2008).

Um dos principais problemas que interfere na vida de prateleira do mel está vinculado à deterioração pela fermentação e, segundo White Jr. (1978), os microrganismos osmofílicos (tolerantes ao açúcar e condições ácidas), presentes no corpo das abelhas, no

néctar, no solo, nas áreas de extracção e armazenamento, podem provocar a fermentação no mel quando a humidade for elevada (Bogdanov *et al.*, 1999).

Deste modo, a quantidade de água presente é um factor essencial para a determinação da fermentação no mel. No entanto, verificou-se que não é a quantidade mas sim a actividade de água presente nos alimentos que controla o crescimento microbiano (Chirife *et al.*, 2006). Assim, a actividade da água (a_w) é o factor limitante mais importante para prevenir o crescimento microbiano, e, em alguns casos, é o parametro principal responsável pela estabilidade dos alimentos (Chirife *et al.*, 2006). Este valor, no mel, varia entre 0,5 e 0,6 (Abramovic *et al.*, 2008).

Como os méis são soluções supersaturadas de glucose, esta pode cristalizar espontaneamente à temperatura ambiente formando glucose monohidratada. A cristalização do mel (granulação) baixa a concentração de glucose (soluto) na fase líquida e consequentemente aumenta a actividade da água, que pode levar à multiplicação natural de leveduras, causando a fermentação do mel.

Os méis cristalizam de formas diferentes com o tempo. Alguns podem cristalizar uniformemente, enquanto outros deixam uma porção líquida na superfície (Zamora and Chirife, 2006). Desta forma, os méis podem ser classificados de acordo com a sua textura: méis líquidos claros, méis sólidos granulados ou cristalizados e méis parcialmente cristalizados, mistura de méis líquidos com méis cristalizados (Abramovic *et al.*, 2008; Zamora and Chirife, 2006; Zamora *et al.*, 2006; Chirife *et al.*, 2006).

2.3.2 pH

Vários estudos demonstraram para vários tipos de méis que a acidez se encontrava entre 3,52 a 75,50 meq/Kg de mel, pelo que a determinação do pH no mel pode ser utilizada como uma análise auxiliar para a avaliação da acidez total (Arruda, 2003).

Todos os méis são ácidos, e o seu valor é influenciado pela origem botânica que lhe deu origem, bem como pela concentração de ácidos e minerais (Sodré *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2005), pelo que não é susceptível ao crescimento da maioria das bactérias.

Segundo vários estudos, o valor de pH, no mel, pode variar entre 2,3 e 7,23 (Arruda, 2003), sendo o normal entre 3.2 e 4.5 (Sato and Miyata, 2000) pelo que alguns valores fora deste intervalo podem indicar fermentação ou adulteração do mel (Carvalho *et al.*, 2005).

2.3.3 Cor

O mel pode variar de uma tonalidade incolor a castanho-escuro. Vários autores efectuaram estudos sobre a cor no mel e verificaram, que para méis de diferente origens,

existia uma predominância da cor clara em relação à cor escura (Arruda, 2003).

A origem floral do mel confere-lhe a sua coloração, uma vez que esta é influenciada por factores climatéricos durante o fluxo do néctar, pela temperatura durante o amadurecimento do mel na colmeia e pelo seu processamento. No entanto, esta propriedade física pode também ser alterada pela luz, calor, tempo de armazenagem e reacções enzimáticas (Sodré *et al.*, 2007; Campos, 1987).

O escurecimento do mel ocorre durante o armazenamento devido a reacções *Maillard*, que ocorrem quando os açúcares reagem com os aminoácidos livres, levando à formação de vários pigmentos castanhos (Turkmen *et al.*, 2006) e depende da temperatura e/ou tempo de armazenamento (Bertoncelj *et al.*, 2007). Alguns dos produtos provenientes das reacções de *Maillard* actuam como antioxidantes. A cor escura é também indicadora da presença de elevada composição de minerais e compostos fenólicos (Bath & Singh, 1999).

2.3.4 Glícidos

O mel é um produto natural, saturado de açúcares (cerca de 95% da matéria seca), predominando os monossacarídeos: frutose (38%) e glucose (31%) (Gheldof and Engeseth, 2002) que são responsáveis pelas qualidades e propriedades físicas, viscosidade, propriedades térmicas, valor energético, granulação e actividade antimicrobiana (White Jr., 1979; Crane, 1990; White, 1975). Na legislação Portuguesa, o teor mínimo permitido destes monossacáridos é de 60g/100g de mel.

Vários estudos indicaram também uma fraca presença de outros monossacáridos relacionados com a origem floral do mel: xilose, ribose, arabinose, manose e galactose (Crane, 1990; Swallow & Low, 1990). Outros açúcares, que entram também na sua constituição são: a sacarose, maltose e outros dissacáridos (Mateu & Bosch-Reig, 1997).

A glucose e a frutose são de elevada importância para o mel, uma vez que a glucose determina a tendência de cristalização deste, devido à sua fraca solubilidade, enquanto a frutose favorece a doçura. E é esta última que predomina na maioria dos méis. (White Jr., 1979; Sodré *et al.*, 2007).

De todos os açúcares, a sacarose representa cerca de 2 a 3% dos glícidos. Quando este valor é superior é indicativo da colheita prematura do mel ou da adulteração do mesmo, visto que esta ainda não foi totalmente dissociada em glucose e frutose, pela acção da enzima invertase, secretada pelas abelhas (Küçük *et al.*, 2007; Sodré *et al.*, 2007). No entanto, alguns méis podem não apresentar este valor elevado, mesmo quando colhidos prematuramente, o que pode ser explicado porque os néctares de origens florais diferentes possuem diferenças na sua composição química em açúcares (Vargas, 2006).

Quadro 1 – Composição química do mel, adaptado de Bogdanov, 2009

	Blossom honey		Honeydew honey	
	average	min-max	average	min-max
Water content	17.2	15-20	16.3	15-20
Fructose	38.2	30-45	31.8	28-40
Glucose	31.3	24-40	26.1	19-32
Sucrose	0.7	0.1-4.8	0.5	0.1-4.7
Other disaccharides	5.0	28	4.0	16
Melezitose	<0.1		4.0	0.3-22.0
Erlose	0.8	0.56	1.0	0.16
Other oligosaccharides	3.6	0.5-1	13.1	0.1-6
Total sugars	79.7		80.5	
Minerals	0.2	0.1-0.5	0.9	0.6-2
Amino acids, proteins	0.3	0.2-0.4	0.6	0.4-0.7
Acids	0.5	0.2-0.8	1.1	0.8-1.5
pH	3.9	3.5-4.5	5.2	4.5-6.5

2.3.5 Ácidos Orgânicos

Bogdanov descobriu que a actividade antimicrobiana do mel não está directamente relacionada com o seu pH, mas sim com o seu conteúdo em ácidos.

Está descrito na literatura que os ácidos orgânicos constituem cerca de 0,5% dos sólidos constituintes do mel, e que são responsáveis pelo seu sabor (White Jr., 1979, 1992) e paladar (Nozal *et al.*, 1998). Na Figura 3 estão representados alguns ácidos orgânicos.

O nível de acidez deve-se à quantidade de minerais presentes no mel e aos ácidos orgânicos, podendo ser um indicador das condições de armazenamento e processos de fermentação, uma vez que contribui para a estabilidade do mel contra os microrganismos (White Jr., 1978; Mendonça *et al.*, 2008).

Existem cerca de 19 ácidos orgânicos identificados em méis (Crane, 1990). O ácido fórmico (conservante) foi o primeiro a ser reconhecido no mel por Vogel em 1882 (White, 1975). Numa primeira análise pensou-se que o ácido cítrico predominava no mel, com pequenas quantidades de ácido fórmico, acético, butírico, málico e succínico (Nelson and Mottern, 1931). No entanto, em 1960, Stinson *et al.* verificou que o ácido orgânico presente em maior quantidade no mel era o ácido glucónico (ácido não volátil). Este ácido está em equilíbrio com a gluconolactona, que é formada pela acção do enzima glucose-oxidase (White *et al.*, 1963), produzido pelas glândulas hipofaringeanas das abelhas e pela acção das bactérias durante o processo de maturação do mel (Ruíz-Argüeso and Rodríguez-Navarro, 1973; Bogdanov, 1997). A reacção catalisada pelo glucose-oxidase também produz peróxido de hidrogénio que contribui para a actividade antimicrobiana do mel (White and Subers, 1963; Campos, 1987). O peróxido de hidrogénio é posteriormente degradado em oxigénio e água pelo catalase.

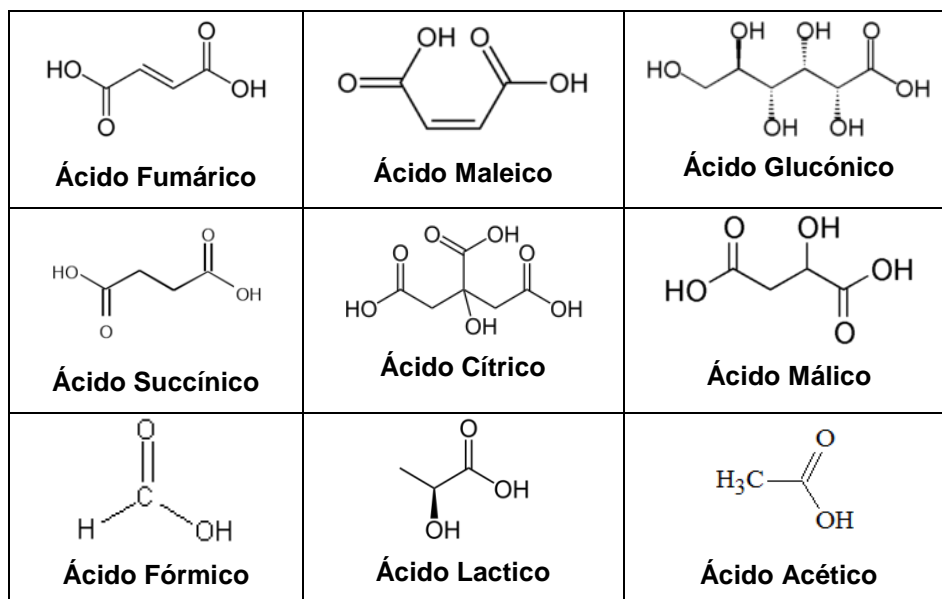


Figura 3 - Estrutura química de alguns ácidos orgânicos.

Visto que o ácido glucónico é o ácido predominante no mel, vários autores consideraram que era determinante existir um procedimento analítico de forma a determinar a quantidade total do ácido D-glucónico (ácido D-gluconico e D-glucono- δ -lactona) no mel. A determinação da quantidade total do ácido D-glucónico, por HPLC, é dispendiosa e não permite a separação do ácido D-glucónico e a D-glucono- δ -lactona, pelo que foi fundamental determinar outro método que permitisse a sua determinação. Em 1989, foi elaborado um método enzimático de determinação deste ácido em vários produtos alimentares, tais como carne e vinhos, e em 1997, Mato *et al.* aplicou este método ao mel. Neste, a determinação da concentração total do ácido D-glucónico é determinada directamente pela extinção do coeficiente do NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato), visto que em soluções aquosas a hidrólise total da D-glucono- δ -lactona, garantida quando se ajusta o pH da amostra para 10,5 com KOH (hidróxido de potássio) durante 10 minutos, origina ácido D-glucónico a pH 7,8 (Boehringer-Mannheim GmbH, 1989). Desta forma, a concentração de NADPH formada é estequiométrica com a quantidade de ácido D-glucónico, pelo que pode ser medida pelo aumento da absorvência a 340 nm.

Presentemente, foram identificados no mel, além do ácido glucónico, outros ácidos orgânicos como os ácidos acético, butírico, cítrico, fórmico, láctico, maleico, málico, oxálico, succínico, fumárico, málico, maleico, pirúvico, ascórbico (Strison *et al.*, 1960; White, 1975; Arruda, 2003; Suárez-Luque *et al.*, 2002a e b).

Num estudo realizado por Bogdanov *et al.* (1999), no qual foi avaliada a influência de três ácidos orgânicos (ácido fórmico ácido oxálico e ácido láctico), utilizados no controlo contra a *Varroa*, mas que ocorrem também, naturalmente no mel. Na qualidade do me,

estes autores verificaram que os teores destes ácidos no mel, após utilização contra a *Varroa*, são baixos e seguros, e que o sabor do mel é afectado principalmente pelo ácido fórmico e menos pelo ácido láctico. Puderam concluir ainda que, após a aplicação de ácido fórmico no Outono, no final da temporada da abelha, a quantidade deste ácido aumenta substancialmente e pode ultrapassar, em muito, o teor deste ácido no mel natural. No entanto, a concentração deste ácido diminui lentamente devido à evaporação para atingir o nível original na Primavera seguinte. Desta forma, é recomendável a utilização deste ácido em tratamentos no Outono, sem quaisquer consequências negativas para o gosto do mel colhido na Primavera seguinte. Em relação ao ácido oxálico, verificaram que após o tratamento no Outono a concentração deste ácido não aumentou no mel do ano seguinte. Desta forma, a sua aplicação no Outono pode ocorrer sem qualquer risco para a qualidade do mel. De igual modo, o teor em ácido láctico aumenta até 1500 mg/kg, imediatamente após a sua aplicação no Outono. No entanto, após quatro semanas, este diminui para cerca de 500 mg/kg, pelo que a sua utilização no controlo da *Varroa* pode ser realizado na Primavera até quatro semanas antes do início do fluxo de néctar (Bogdanov *et al.*, 1999). Em relação ao ácido cítrico, a sua concentração no mel é usada como um parâmetro fiável para a diferenciação de dois tipos principais de méis: mel floral e melato (Suarez-Luque *et al.*, 2002a).

Em extractos de méis uniflorais da Nova Zelândia foram identificados, por cromatografia gasosa, trinta e dois ácidos dicarboxílicos alifáticos como metilésteres. Os componentes, o ácido 2-metilbutanodióico e o ácido 4-hidroxi-3-metil-*trans*-2-pentenodióico foram propostos como substâncias marcadoras para o mel de *Rewarewa* (*Knigthea excelsa*) da Nova Zelândia (Anklam, 1998).

2.3.6 Aminoácidos e Proteínas

As proteínas ocorrem em pequena quantidade no mel, menos de 0,5% (Anklam, 1998), podendo ter duas origens, vegetal proveniente do néctar e pólen e animal proveniente da abelha, secreções das glândulas salivares e produtos recolhidos no processo de colheita do néctar ou maturação do mel (White and Rudyj, 1978; Campos, 1987). A sua concentração é usada juntamente com o conteúdo de água, na detecção de adulteração do produto comercial.

Em méis Australianos encontraram-se vários aminoácidos livres em amostras de mel, por exemplo, leucina, isoleucina, histidina, metionina, alanina, fenilalanina, glicina, ácido aspartico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, valina, cisteína, tirosina, lisina e arginina (Wootton *et al.*, 1976).

No entanto, de todos os aminoácidos encontrados no mel, a prolina é o que existe em maior quantidade, representando cerca de 50 a 85% do total (Anklam, 1998; White & Rudyj, 1978).

Foram analisados por cromatografia gasosa (GC) vários tipos de mel de diferentes fontes botânicas (acácia, citrinos, castanha, alecrim e limão) de forma a obter um padrão de aminoácidos para a sua classificação. Verificou-se que a presença de alguns aminoácidos, tais como a arginina, triptofano e cisteína eram característicos de alguns tipos de méis (Anklam, 1998).

2.3.7 Enzimas

Segundo Crane (1987), a adição de enzimas pelas abelhas ao néctar irá causar mudanças químicas, aumentando a quantidade de açúcar.

Cerca de $\frac{3}{4}$ da sacarose inicial do néctar recolhido é transformada pelo enzima invertase, em glucose e frutose até ao amadurecimento total do mel. Este enzima permanece no mel conservando a sua actividade, exceptuando quando é inactivado por aquecimento.

Vários autores detectaram no mel outros enzimas, tais como a invertase, glucose oxidase, diastase, catalase (Anklam, 1998), alfa-glicosidase, peroxidase, lipase, amilase, fosfatase ácida e inulase (Oddo *et al.*).

O diastase quebra o amido, e a sua função fisiológica na abelha pensa-se estar envolvida na digestão do pólen. Este enzima apresenta um elevado grau de instabilidade quando colocado a altas temperaturas, sendo portanto importante na detecção de possíveis aquecimentos no mel comercializado.

Weston (2000) afirmou que a concentração do catalase presente no mel, originária do pólen das flores, depende da fonte floral e quantidade de pólen recolhido pelas abelhas.

O glucose oxidase é o enzima principal e é originado nas glândulas das abelhas. Em soluções altamente diluídas o glicose oxidase torna-se mais activo (White, 1975), uma vez que reage com a glicose formando acido glucónico, principal ácido do mel, e peróxido de hidrogénio (Pereira *et al.*, 2003). Este é o principal composto antimicrobiano existente no mel (White *et al.*, 1963), e a sua concentração depende dos níveis de glicose oxidase e de catalase (Weston, 2000).

2.3.8 Cinzas, Minerais e Vitaminas

O teor de cinzas expressa o conteúdo de minerais presentes no mel, sendo também utilizado, como um critério de qualidade (Bogdanov *et al.*, 1999) que está relacionado com

sua origem botânica (Bogdanov *et al.*, 2004; Oddo *et al.*), e normalmente, apresenta um valor baixo (Finola *et al.*, 2007).

Os minerais encontram-se em pequenas quantidades no mel, e o seu conteúdo varia entre 0,04% nos méis claros e 0,2% em alguns méis escuros. O conteúdo em minerais do mel pode fornecer indicações acerca da poluição ambiental ou da origem geográfica do mel (Anklam, 1998).

Dos elementos químicos inorgânicos constituintes do mel encontram-se o cálcio, cloro, cobre, ferro, manganês, magnésio, fósforo, boro, potássio, silício, sódio, enxofre, zinco, nitrogénio, iodo, rádio, estanho, ósmio, alumínio, titânio e chumbo (White, 1975; White Jr., 1979), sendo o potássio é o mais abundante (Anklam, 1998; Pereira, 2008).

Os minerais são fundamentais na coloração do mel, estando presente em maior concentração nos méis escuros (Ortiz-Valbuena, 1989) mas, a proporção pode ser alterada em função de diversos factores: origem floral, região e espécie de abelhas (Bogdanov, 1997; Carvalho *et al.*, 2005).

No mel existem também vitaminas, embora em concentrações mínimas, tais como, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, C e D. Estas são facilmente assimiladas pela associação a outras substâncias como o hidrato de carbono, sais minerais, oligoelementos ou ácidos orgânicos.

2.3.9 Hidroximetilfurfural (HMF)

O hidroximetilfurfural (HMF) é formado pela reacção de determinados açúcares, por exemplo frutose, com ácidos provocado pelo aquecimento ou pelas reacções de *Maillard* (Küçük *et al.*, 2007). Concentrações elevadas de HMF nos méis de *Apis mellifera* podem indicar importantes alterações, tais como armazenamento prolongado, temperatura ambiente elevada e/ou sob aquecimento (White Jr., 1978; Sodré *et al.*, 2007). Desta forma um mel de elevada qualidade deverá ter um teor de HMF baixo (Küçük *et al.*, 2007).

2.3.10 Compostos Fenólicos

Verificou-se que alguns méis continham actividade antimicrobiana após remoção do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) pelo catalase. Nestes casos, a actividade antimicrobiana não peroxidásica do mel foi atribuída aos seus componentes provenientes da fonte floral que lhe deram origem, dentro dos quais os compostos fenólicos (Estevinho *et al.*, 2008; Aljadi and Kamaruddin, 2004; Meda *et al.*, 2005).

Assim, os principais constituintes antioxidantes são os compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), que se caracterizam pela presença de um ou mais grupos

hidroxilo ligado directamente a um anel aromático (Marcucci, 1998), representado na Figura 2.

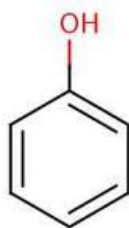


Figura 4 - Estrutura de um fenol.

Alguns destes compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres de fenol) são responsáveis pela bioactividade contra vários microrganismos patogénicos (Bankota *et al.*, 1998; Burdock, 1998). Tem-se verificado que a composição destes compostos depende qualitativamente e quantitativamente da ecoflora da região colectada e/ou espécie de abelhas (Parck *et al.*, 1998; Tomás-Barberán *et al.*, 2001). Deste modo, a sua identificação por HPLC pode ser utilizada como marcador da origem botânica de méis e determinação da sua origem geográfica em méis uniflorais, através de padrões de flavonóides característicos, como é o caso do mel de urze, mel de citrinos, mel de girassol (Anklam, 1998).

Alguns dos ácidos fenólicos que conferem actividade antioxidante são os ácidos benzóico, caféico, cumárico e ferúlico. No entanto, os ácidos gálico e *p*-cumárico, foram identificados como dominantes e os ácidos cafeíco, ferúlico, elágico, clorogénico, siríngico, vanílico, cinâmico e *p*-hidroxibenzoico identificados como constituintes minoritários, por HPLC (Andrade *et al.*, 1997a; Bertoneclj *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2008; Aljadi and Yusoff, 2003).

Uma forte correlação foi também encontrada entre a actividade antioxidante e a cor do mel. Muitos autores constataram que méis com coloração escura têm um maior teor de fenóis totais e, conseqüentemente, uma maior capacidade antioxidante (Beretta *et al.*, 2005).

Os principais flavonóides presentes no mel pertencem aos grupos das flavanonas e flavonas. Os principais flavonóides presentes no mel são miricetina, tricetina, quercetina, hesperetina, luteolina, caempferol, pinocembrina, crisina, e galangina (Anklam, 1998; Yao *et al.*, 2004; Bertoneclj *et al.*, 2007).

A fracção de flavonóides recolhida do néctar de urze em Portugal, mostrou que existem quatro flavonóides principais, quercetina, canferol-3-ramnopiranosídeo, miricetina-3-*o*-metil éter e *isorhamnetin-3-ramnoside* (Anklam, 1998).

A análise de flavonóides no mel de laranjeira revelou a presença de um flavonóide característico, a hesperetina. Este composto pode, deste modo, funcionar como indicador da origem floral do mel de laranjeira. As pesquisas realizadas mostraram, também, a presença de ácido abscísico no mel de urze, canferol no mel de alecrim e quercetina no mel de girassol, os quais constituem importantes indicadores da origem floral de cada um destes tipos de mel. O ácido gálico é característico do mel *Lavandula stoechas*, enquanto o mel *Erica* sp. é caracterizado pela presença dos ácidos *p*-hidroxibenzóico, siríngico, *o*-cumárico e elágico. Este último já tinha sido comprovado como sendo um marcador para a origem floral (Andrade et al., 1997a).

O mel de urze tem o maior teor de derivados de ácidos fenólicos e pequenas quantidades de flavonóides. Em contraste, os méis de frutas cítricas e alecrim são caracterizadas por pequenas quantidades de derivados de ácidos fenólicos, hesperetina e 8-metoxi-camferol, respectivamente (Anklam, 1998).

2.4 ANÁLISE POLÍNICA

Há muito que se sabe que o sabor, aroma, cor e características organolépticas dos méis dependem de variações na composição do néctar recolhidos das diferentes fontes florais (Dias et al., 2008). Vários autores, incluindo Willard et al. (2004), Sodr e et al. (2007b), Sodr e et al. (2008), Rowe (2005), Moar (1985), Maia et al. (2005), Andrade et al. (1999) t em relatado descri oes dos grãos de pólen encontrados no mel, e demonstraram que as análises polínicas permitiam determinar a origem geográfica dos mesmos, nascendo assim a melissopalino ogia.

A flora apícola é definida como o conjunto de espécies vegetais que oferecem o néctar e pólen às abelhas. Pastagem apícola é a área de plantas melíferas que fornecem néctar, pólen e própolis às abelhas, que os utilizam como fonte de sobrevivência e produção de produtos apícolas (Weise, 1995).

O conhecimento da origem floral dos méis é importante para a caracterização do produto, sendo a análise polínica considerada uma ferramenta para reconhecimento das plantas apícolas utilizadas pelas abelhas, como suprimento de néctar e pólen (Hower, 1953; Almeida-Anacleto, 2007).

O pólen (Figura 5)   assim um indicador da origem botânica do mel, e por meio da análise quantitativa deste,   possível estabelecer a proporção com que cada planta contribui para a constituição do mel (Iwama & Melhem, 1979).

A identificação das espécies vegetais visitadas pelas abelhas torna-se muito importante para os apicultores, com o objectivo de otimizar a produção de mel, visando o maior aproveitamento dos recursos da vegetação natural, bem como na preservação e

multiplicação destas plantas, de modo a estabelecer uma apicultura sustentável (Sodré *et al.*, 2008). Assim, a produção do mel depende da abundância e da qualidade das flores existentes no raio de acção das abelhas, cerca de 3 km.

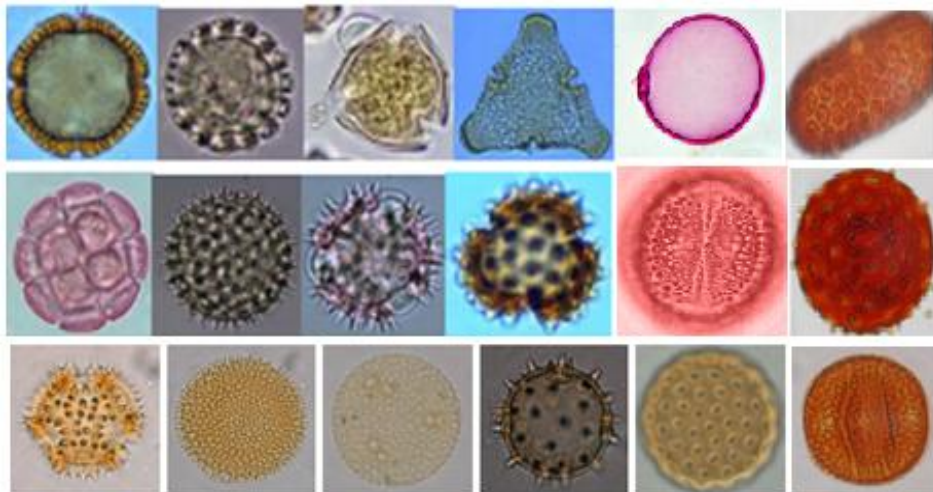


Figura 5 – Esquemas de grãos de pólen de diferentes origens botânicas.

Adaptado: "Neotropical Pollen Database" e www.terra-scenica.pt

A análise polínica é um requisito internacional de forma a fazer um controlo da qualidade do mel (Aira *et al.*, 1998), uma vez que permite uma “impressão digital” do ambiente circundante à colmeia, evidenciando a sua origem botânica e geográfica da planta fornecedora (Almeida-Anacleto, 2007), bem como na detecção de adulterações (Sodré *et al.*, 2008).

A fonte de alimento das abelhas é o néctar e o pólen, uma vez que são estes que fornecem proteínas, vitaminas e sais minerais, pelo que a sua ausência poderá levar à extinção da colmeia.

Vários autores demonstraram a importância da análise quantitativa e qualitativa dos grãos de pólen encontrados no mel para estabelecer a proporção da contribuição de cada planta na constituição do mel, bem como da sua origem botânica e geográfica (Iwama & Melhen, 1979; Barth, 1989; Arruda, 2003). Também conferiram que várias espécies botânicas floriam em alturas diferentes, pelo que a utilização de um calendário apícola permitiria um planeamento da produção de mel

Em Portugal o mel de urze é produzido a partir de *Erica* spp., o qual é caracterizado pelo seu sabor forte e cor escura. A influência do clima mediterrâneo na região do Alentejo determina a dominância da classe *Cisto-Lavanduletea*, em que a *Cistus ladanifer* (esteva) e o rosmaninho (*Lavandula stoechas*) fornecem o néctar (Maia *et al.*, 2005).

2.4.1 Flora dos Açores

Os açores têm uma flora endêmica diversificada (Quadro 2). No entanto, esta foi ameaçada pela colonização no séc. XV, pela introdução do *Pittosporum undulatum* (incenso) e a *Hydrangea macrophylla* (hortênsia).

Quadro 2 - Plantas de interesse apícola nos Açores (Botelho, 2001)

Nome Vulgar	Nome Científico
Plantas Principais:	
Incenso	<i>Pittosporum undulatum</i> vent.
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i> labill
Trevo Branco	<i>Trifolium repens</i> L.
Luzerna	<i>Medicago polymorpha</i> L.
Metrosídero	<i>Metrosideos excelsa</i> L.
Acácia	<i>Acacia melanoxylon</i> R. Br.
Hortelã	<i>Mentha rotundifolia</i> L.
Plantas Complementares:	
Alecrim	<i>Rosmanius officinalis</i> L.
Borragem	<i>Borago officinalis</i> L.
Poejo	<i>Mentha pulegium</i> L.
Néveda	<i>Satureja nepeta</i> L. Scheele
Dente-de-leão	<i>Taraxacum officinale</i> Weber
Silva	<i>Rubus</i> spp.
Confeito	<i>Poligonum capitatum</i> Buch.-Hann
Orégão	<i>Origanum virens</i>

O incenso (Figura 6) tornou-se de grande interesse para a apicultura visto florir quando há menor abundância de flores (Fevereiro a Abril), o que permite que as abelhas a visitem mais, resultando na recolha de néctar e pólen durante praticamente todo o ano.



Figura 6 - *Pittosporum undulatum*.

2.4.2 Melissopalinologia

O pólen pode ser considerado como um constituinte natural do mel, sendo a identificação botânica e geográfica do mel efectuada através do espectro polínico. Este é efectuado através de um exame microscópico, onde se realiza a contagem e identificação dos grãos de pólen no mel diluído em água destilada. (Sodré *et al.*, 2008; Sawyer & Pickard, 1988). Através da análise sobre os tipos de grãos de pólen existentes na composição do mel pode-se classificá-lo em monofloral ou multifloral. Vários estudos enfatizaram a comparação entre méis monoflorais de forma a distinguir os tipos de méis, avaliando as características físico-químicas, bem como a análise polínica (Arruda, 2003).

A predominância de um tipo de pólen acima de 45% representa a origem botânica do mel; de 15 a 45% indica que foi recolhido pólen de outras plantas; e menor que 15% fornece a proveniência geográfica da amostra. Porém, um mínimo de 10% de pólen de *Citrus* sp. é suficiente para considerar o mel monofloral. Por outro lado, o mel de castanheiro, para ser considerado monofloral, necessita de 90% de pólen de *Castanea* Mill., devido à sua baixa produção de néctar (Anklam, 1998). Assim, não existe uma relação fixa e constante, pelo que cada espécie polínica deve ser considerada individualmente (Barth, 1970).

Dias *et al.* em 2008 efectuaram um estudo, em Portugal, onde verificou que o pólen predominante era proveniente de três espécies florísticas: *Erica*, *Echium* e *Lavandula*. Para se considerar um mel monofloral de *Lavandula* basta que este tenha apenas 15% deste pólen. No entanto, o mel de *Erica* e *Echium* necessitam de 45%.

As características físico-químicas e polínicas do mel ainda são pouco conhecidas, principalmente em regiões tropicais, onde existe grande diversidade de flora apícola associada às taxas elevadas de temperatura e humidade.

Uma das limitações da melissopalinologia é que as várias espécies produzem diferentes proporções de pólen, e esta quantidade varia entre estações do ano. Outra limitação diz respeito à sua autenticidade, uma vez que o pólen pode ser adicionado de forma fraudulenta ao mel (Anklam, 1998). Devido a estes factores limitantes, a utilização dos critérios físico-químicos como a análise de condutividade eléctrica e o pH têm surgido de uma forma complementar à análise polínica no que diz respeito à caracterização de méis monoflorais (Zamora *et al.*, 2006).

A maior parte dos grãos de pólen encontrados no mel são provenientes de plantas fornecedoras de néctar, chamadas de nectaríferas, pelo que estas são as mais importantes na produção de mel, visto que estas produzem muito néctar e pouco pólen, pelo que muitas vezes são sub-representadas nos espectros polínicos, como é o caso do *Eucalyptus*, das frutas cítricas (*Citrus* sp.), das *Mimosaceae* e das *Asteraceae*. No entanto, uma certa percentagem do pólen no mel pode ainda ser proveniente de plantas anemófilas, ou seja, de

flores que não produzem néctar, somente pólen, mas que pode ser de interesse para as abelhas como fonte de proteínas. Entre estas plantas, encontra-se com maior frequência várias espécies de *Cecropia*, de *Poaceae*, entre as quais o milho, e de *Cyperaceae*. Existe ainda um terceiro tipo de plantas, as poliníferas que, além de terem pouco néctar fornecem muito pólen. Estas costumam ser super-representadas nos espectros polínicos. Entre estas plantas encontram-se as espécies do género *Mimosa* e *Melastomataceae* (quaresmeiras).

2.5 PROPRIEDADES BIOACTIVAS DO MEL

A fonte floral que dá origem ao mel é determinante para as suas capacidades terapêuticas e desempenha um papel fundamental nas suas propriedades biológicas (Basualdo et al., 2007; Beretta et al., 2005).

2.5.1 Actividade Antioxidante

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são produtos normais do metabolismo celular, cujo efeito nocivo é designado por *stress oxidativo* (Valko et al., 2007). Estas são responsáveis por anomalias celulares e o consumo regular de antioxidantes parece limitar ou prevenir os seus efeitos nefastos (Kaur and Geetha, 2006).

É denominado antioxidante qualquer substância presente em baixas concentrações, quando comparada com o substrato oxidável, que atrasa significativamente ou previne a oxidação desse mesmo substrato (Al-Mamary et al., 2002).

Tem havido um aumento da pesquisa sobre as propriedades antioxidantes de produtos naturais, devido à função dos antioxidantes na inibição dos radicais livres resultantes do metabolismo celular. Desta forma, a actividade antioxidante é uma das funções fisiológicas mais importantes nos alimentos, devido à sua protecção nos danos oxidativos nos organismos vivos, que resultam na prevenção de várias doenças, como cancro, doenças cardiovasculares e diabetes (Inoue et al., 2005; Nagai et al., 2001; Bertoncelj et al., 2007).

O consumo de alimentos de origem vegetal tem sido associado a uma diminuição do risco de doenças crónicas e degenerativas como as doenças cardiovasculares, cancro, diabetes e envelhecimento. Esta protecção proporcionada pelo consumo destes alimentos pode ser explicada pela presença de antioxidantes que protegem o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reacções que podem causar oxidação excessiva devido à produção dos radicais livres responsáveis pela oxidação dos lípidos, ácidos nucleicos e proteínas nos alimentos (Gheldof et al., 2002; Nagai et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado o poder antioxidante do mel na prevenção das reacções oxidativas que deterioram os alimentos, tais como a oxidação dos lípidos na carne

e o escurecimento enzimático de frutos e vegetais (Gheldof *et al.*, 2002; Bertoncelj *et al.*, 2007). No entanto, a capacidade antioxidante do mel varia com a fonte floral que lhe dá origem (Frankel *et al.*, 1998).

Os antioxidantes sintéticos, como o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), propilgalato (PG) e *tert*-butilhidroquinona (TBHT) são actualmente utilizados como aditivos alimentares para prevenir a deterioração das gorduras nos alimentos (e.g. oxidação lipídica na carne, escurecimento enzimático em frutos e vegetais (Aljadi and Yusoff, 2003).

Dado que alguns estudos apontam para um possível efeito pró-carcinogénico dos antioxidantes sintéticos, tem aumentado o interesse da utilização de antioxidantes de origem natural em vez de sintéticos, nomeadamente certas especiarias, ervas aromáticas e mel (Abdalla and Roozen, 1999). Como consequência tem aumentado também o interesse na utilização de métodos que permitam estimar a eficiência dessas substâncias naturais como antioxidantes (Sánchez-Moreno, 2002; Schwarz *et al.*, 2001; Molyneux, 2003).

Os componentes no mel responsáveis pelo seu efeito antioxidante são flavonóides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, catalase, peroxidase, carotenóides e os produtos da reacção de *Maillard*. A quantidade desses componentes varia amplamente de acordo com a origem floral e geográfica do mel, bem como com a sua manipulação, processamento e armazenamento (Bertoncelj *et al.*, 2007; Gheldof *et al.*, 2002).

Recentemente, têm sido publicados inúmeros estudos sobre a avaliação da actividade antioxidante do mel (Meda *et al.*, 2005; Küçük *et al.*, 2007). Muitos investigadores verificaram que os méis escuros apresentam um teor em compostos fenólicos superior e consequentemente, uma maior actividade antioxidante (Taormina *et al.*, 2001; Bertoncelj *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2008).

Com o aumento das evidências epidemiológicas das actividades antioxidantes de certos alimentos surgiu a necessidade de elaborar métodos que permitissem determinar a actividade antioxidante. O primeiro método para determinação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) foi elaborado por Marsden Blois (Molyneux, 2003).

Outros métodos foram elaborados e baseados na captura do radical peróxilo ("Oxygen Radical Absorbance Capacity" - ORAC), no poder de redução de metais ("Ferric Reducing Antioxidant Power" - FRAP, "Ccupric Reducing Antioxidant Capacity" - CUPRAC), captura do radical hidroxilo (método de desoxirribose), na captura de radicais orgânicos (DPPH) e na quantificação de produtos formados durante a peroxidação dos lípidos ("Thiobarbituric Acid Reactive Substances" - TBARS, oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade), co-oxidação do β -caroteno) (Frankel and Meyer, 2000; Sánchez-Moreno, 2002). No entanto, os mais utilizados actualmente no mel são o FRAP, DPPH e ORAC (Ferreira *et al.*, 2009; Beretta *et al.*, 2005; Pérez-Jiménez and Saura-Calixto, 2006).

2.5.2 Actividade Antimicrobiana

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

O mel pode igualmente ser utilizado na indústria alimentar contra vários microrganismos patogénicos (*Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *S. aureus*) (Mundo *et al.*, 2004). Desta forma pode ser utilizado como alimento no pão; no molho de saladas, visto inibir as culturas "starters" de bactéria do ácido láctico; nas bebidas, visto que a maior dos seus hidratos de carbono são fermentáveis; como antioxidante, visto que os seus ácidos fenólicos, enzimas e ácido ascórbico inibem a oxidação lipídica da carne (Dekker, 1998).

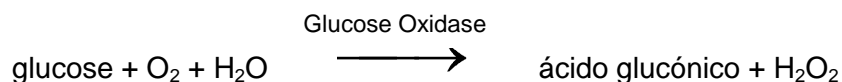
Devido à sua complexidade, o mel tem sido alvo de várias investigações sobre a sua actividade antimicrobiana, nomeadamente contra patogénicos resistentes a antibióticos (Molan, 2002; Allen and Molan, 1997; Weston, 2000; Nzeako and Hamdi, 2000), contra bactérias patogénicas envolvidas em algumas doenças (Basualdo *et al.*, 2007), contra bactérias alimentares patogénicas (Taormina *et al.*, 2001) e contra bactérias responsáveis pela deterioração de alimentos (Mundo *et al.*, 2004).

Dold *et al.*, em 1937 foi o primeiro a demonstrar esta actividade, chamando "inibina" à substância que inibia bactérias (Mavric *et al.*, 2008). White and Subers (1963) verificaram que essa substância era o peróxido de hidrogénio (Jeffrey and Echazarreta, 1996). Posteriormente outras substâncias, como os flavonóides foram encontradas no mel.

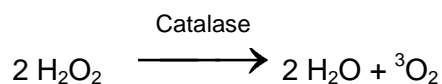
Inicialmente o H₂O₂ era o agente antimicrobiano mais conhecido. Contudo, mais tarde, pensou-se que este poderia causar inflamações e danos nos tecidos (Molan, 2001). No entanto, a concentração de H₂O₂ produzido no mel é de 1 mmol/L, cerca de 1000 vezes menor do que nas soluções de 3% de anticéptico (Molan, 1992). Desta forma, os efeitos prejudiciais do H₂O₂ são reduzidos, visto que no mel este capta e inactiva o ferro livre que catalisa a formação dos radicais livres de oxigénio pelo H₂O₂ e assim ajuda os componentes antioxidantes a retirarem os radicais do organismo (Molan, 2001).

Os factores associados à actividade antimicrobiana do mel são o pH baixo causado pelos ácidos orgânicos, principalmente pelo ácido glucónico, a pressão osmótica elevada ou baixa a_w, o sistema glucose oxidase (Inoue *et al.*, 2005), os fenóis (Mavric *et al.*, 2008; Mundo *et al.*, 2004; Basualdo *et al.*, 2007) e o elevado conteúdo em açúcares (Aljadi and Yusoff, 2003). No entanto, o H₂O₂ é o principal factor associado à actividade antimicrobiana da maioria dos méis, que é produzido enzimáticamente pelo glucose oxidase e secretado pelas abelhas (Molan, 2002; Weston, 2000; Aljadi and Yusoff, 2003; Olaitan *et al.*, 2007).

A propriedade antimicrobiana mais estudada no mel é a acção do enzima glucose oxidase. Este enzima é, virtualmente, inactivo em méis com elevada densidade, mas torna-se activo em méis diluídos de forma a produzir peróxido de hidrogénio e ácido glucónico a partir da glucose. A reacção que demonstra a formação do H_2O_2 é:



O H_2O_2 pode ser degradado a água e oxigénio por iões metálicos ou ácido ascórbico e pelo catalase, que é proveniente do pólen e néctar das plantas (Molan, 2002; Weston, 2000). O nível de peróxido de hidrogénio no mel é, desta forma, determinado pelos níveis de glucose oxidase e catalase (Estevinho *et al.*, 2008).



A produção e o tipo de mel produzido pelas abelhas são dependentes da flora que existe em cada época. Assim, as flores a partir das quais as abelhas recolhem o néctar para produzir o mel, podem contribuir para as diferenças na actividade antimicrobiana deste (Nzeako e Hamdi, 2000; Mundo *et al.*, 2004; Basualdo *et al.*, 2007).

Verificou-se que alguns méis apresentavam actividade antimicrobiana, mesmo quando se retirava o H_2O_2 com catalase, pelo que se pensa que existem compostos com actividade antimicrobiana não peroxidásica. Estes compostos foram encontrados em méis, além do mel de Manuka, incluindo urze, lavanda, "*kanuka*" e "*kamah*" (Allen *et al.*, 1991a e b). Estes compostos não-peróxidos podem ser classificados como (i) compostos derivados de plantas, como os flavonóides, ácidos fenólicos, ácidos não aromáticos, e catalase (ii) derivados do pólen e (iii) compostos proteicos (Brudzynski, 2006; Aljadi and Yusoff, 2003).

Foram efectuados vários estudos sobre a actividade antimicrobiana do mel de Manuka, obtido pela árvore de Manuka (*Leptospermum scoparium*) da Nova Zelândia, visto este ter actividade antimicrobiana não ligada ao H_2O_2 , o que torna possível o seu armazenamento durante longos períodos, sem que haja perda da sua actividade (Allen *et al.*, 1991a e b). Esta propriedade antimicrobiana referida como "Unique Manuka Factor" (UMF) é independente da actividade antimicrobiana produzida pelo H_2O_2 (Mavric *et al.*, 2008).

Foram identificados os dois compostos com maior actividade antimicrobiana no mel de Manuka, o 4-hidroxi-3,5-dimetoxi benzoato e o 3,4,5-trimetoxi benzoato (Aljadi and Yusoff, 2003; Al-Mamary *et al.*, 2002).

Num estudo realizado por Weigel *et al.* (2004), verificou-se que o mel contém quantidades variáveis de compostos 1,2-dicarbonil, tais como o glioxal (GO), metilglioxal (MGO), e 3-deoxiglucose (3-DG), além de 5-hidrometilfurfural, conhecido por ser um indicador do tratamento térmico. Mais tarde, Mavric *et al.*, 2008, demonstrou que o MGO era o componente bioactivo responsável pela actividade antimicrobiana do mel de Manuka, contra *E. coli* e *S. aureus* (Adams *et al.*, 2008).

CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Analisaram-se 27 amostras de mel, das quais 21 eram amostras de méis Portugueses (17 de produção Açoriana - Ilhas de São Miguel, Terceira e Pico, 4 de Portugal Continental - Trás-os-Montes, Serra do Caramulo, Algarve e Alentejo) e 6 de outras Regiões - Austrália, Argentina e Nova Zelândia (Quadro 3).

Quadro 3 - Nome e origem das amostras de mel analisadas.

NOME	REGIÃO	ABREVIATURA
Mel Quinta do Além	S. Miguel (Fajã de Cima)	SM1
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	SM2
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	SM3
Mel Cores	S. Miguel	SM4
Apiário Beatriz Afonso	S. Miguel (Ribeira Grande)	SM5
Apiário Paulo Pavão	S. Miguel	SM6
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	SM7
Mel Quintal dos Açores (3)	S. Miguel (Candelária)	SM8
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	P1
Mel Flor de Incenso	Pico	P2
Mel dos Açores (1)	Terceira	TER1
Apiário Paulo Sousa	Terceira	TER2
Mel dos Açores (2)	Terceira	TER3
Mel dos Açores (3)	Terceira	TER4
Mel dos Açores (4)	Terceira	TER5
Mel dos Açores (5)	Terceira	TER6
Mel dos Açores (6)	Terceira	TER7
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	ALENT
Mel Serras do Algarve	Algarve	ALG
Mel Vinhais Trás-os-Montes	Trás-os-Montes	TM
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	SC
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	AUST1
Mel Natural	Austrália	AUST2
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	NZ
Mel Orgânico (1)	Argentina	ARG1
Mel Orgânico (2)	Argentina	ARG2
Mel Orgânico (3)	Argentina	ARG3

As amostras foram armazenadas no escuro à temperatura ambiente. Os méis analisados apresentavam texturas diferentes, de acordo com os seguintes tipos: mel líquido claro, mel granulado sólido ou cristalizado, mel parcialmente cristalizado (mistura de mel

líquido e cristalizado). O mel açoriano é colhido duas vezes ao ano, a primeira em Abril ou Maio e a segunda em Setembro ou Outubro. As subespécies de abelhas existentes nos Açores são a *Apis mellifera mellefera* (dominante), a *Apis mellifera ligustica* e a *Apis mellifera caucasica* (Pavão, 1997).

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

3.2.1 Determinação da Actividade da Água (a_w)

Alguns méis foram aquecidos a 42-45°C, para diminuir a viscosidade. A actividade da água foi medida a 25°C ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) num medidor de actividade da água electrónico, Water activity measurement instrument LabMaster da Novasina AG. Para cada determinação, pesou-se 3 g de mel, e efectuou-se triplicado, tendo-se determinado posteriormente a sua média e erro padrão da média (SEM).

3.2.2 Determinação do pH

As amostras de mel foram diluídas a 50% (p/v) e determinado o pH por potenciometria, utilizando um pH Inolab da Merck.

3.2.3 Determinação da Cor

No sentido de encontrar possíveis relações entre a actividade antioxidante do mel e a cor, esta foi avaliada segundo o método descrito por Beretta *et al.* (2005).

As amostras de mel foram diluídas para 50% (p/v) e filtradas, através de filtros Whatman 0,45 μm , para eliminar as partículas de maiores dimensões. Posteriormente leu-se a absorvência a 450 nm e 720 nm num espectrofotómetro Hitachi U-2900 da Labodidáctica. Os resultados foram expressos em mAU, 50% (p/v).

3.2.4 Determinação dos Ácidos Orgânicos

A metodologia utilizada para a determinação dos ácidos orgânicos foi adaptada do método descrito por Suárez-Luque *et al.* (2002a e b), que consiste na determinação dos ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) com coluna Purospher® Star, RP-18 (5 μm) da LichroCART®, de fase reversa, a 25°C, a um comprimento de onda de 210 nm, com eluição isocrática a 0,7 mL/min, utilizando como fase móvel uma solução de ácido Orto-fosfórico (Merck, Ref. K10854973) a 4,5% (pH 2,2). O volume de injeção das

amostras foi de 20 μL e todas as amostras e padrões foram injectados em triplicado. Os ácidos orgânicos analisados foram D-málico (Sigma-Aldrich, Ref. 46940-U), cítrico (Sigma-Aldrich, Ref. 46933), succínico (Sigma-Aldrich, Ref. S3674), maleico, fumárico (Sigma-Aldrich, Ref. 47900), láctico e fórmico (Merck) e acético (Riedel-de Haën).

As soluções dos padrões foram preparadas dissolvendo os ácidos em água Milli-Q e guardados a 4°C. As preparações de trabalho foram preparadas diariamente.

Os ácidos orgânicos foram removidos das amostras de mel por um processo de extracção de fase sólida (SPE) com cartuchos de permuta iónica (Sep-Pak[®] Plus Cartridges, Waters). O eluente foi filtrado por filtros de membrana de celulose Whatman 0,45 μm . O procedimento efectudo foi o seguinte: pesou-se 7,5 g de mel e adicionou-se 75 mL de água Milli-Q, de seguida ajustou-se o pH para 10,5 com 0,1 M de NaOH (Merck) e agitou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, ajustou-se novamente o pH para 5 com 0,1 M de H₂SO₄ (Fluka), de forma a evitar-se interferências na linha base e ajustou-se a mistura para 100 ml com Milli-Q H₂O. Filtrou-se 10 ml dessa solução por um filtro de membrana de acetato de celulose 0,45 μm e efectuou-se a SPE. Para a extracção dos ácidos orgânicos, efectuou-se primeiramente a activação dos cartuchos SPE com 10 ml de NaOH 0,1 M, a uma velocidade de 3 ml/min, passando-se de seguida a 10 ml da solução de mel a 0,5 ml/min. Lavou-se o cartucho com 10 ml de água a 3 ml/min e eluiu-se os ácidos orgânicos com 4 ml de ácido sulfúrico 0,1 M a 0,5 ml/min. De seguida, esta solução foi injectada no HPLC Elite Lachrom da VWR Hitachi, incorporado com Autosampler L-2200, FL Detector L-2480, Diode Array Detector L-2450, Pump L-2130 e Column Oven L-2300.

Os ácidos orgânicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos padrões dos ácidos estudados, e foram quantificados por uma curva de calibração padrão externa (Quadro 4).

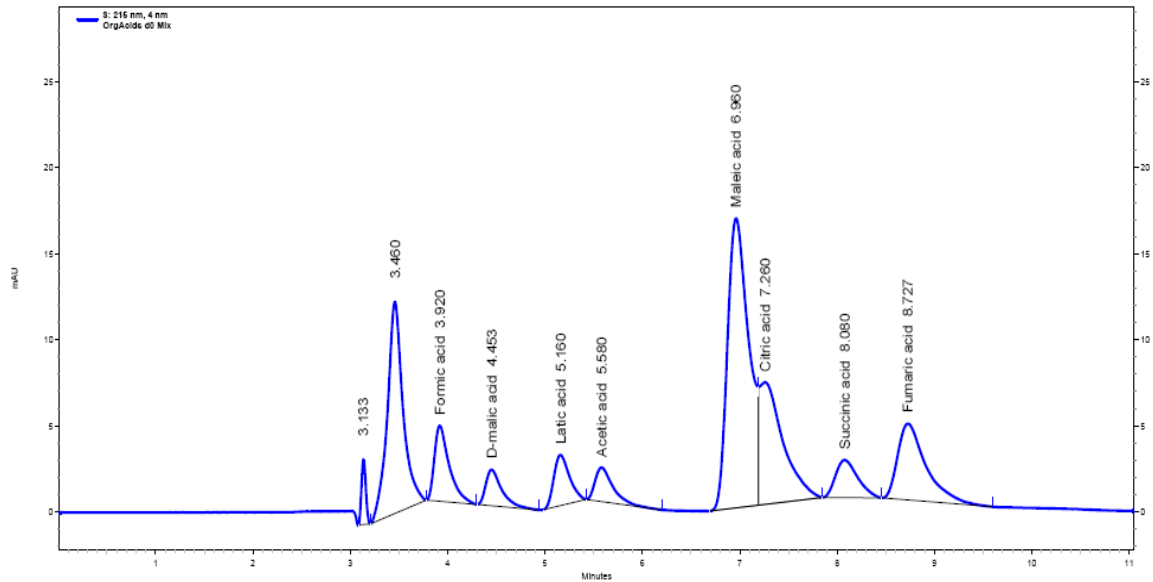
Quadro 4 – Tempos de retenção dos ácidos orgânicos analisados. Os valores indicados representam a média \pm SEM de três determinações.

Ácido Orgânico	Tempo de Retenção (min)
Fórmico	3,92 \pm 0,00
D-málico	4,45 \pm 0,00
Láctico	5,16 \pm 0,00
Acético	5,58 \pm 0,00
Maleico	6,94 \pm 0,00
Cítrico	7,23 \pm 0,01
Succínico	8,07 \pm 0,00
Fumárico	8,71 \pm 0,00

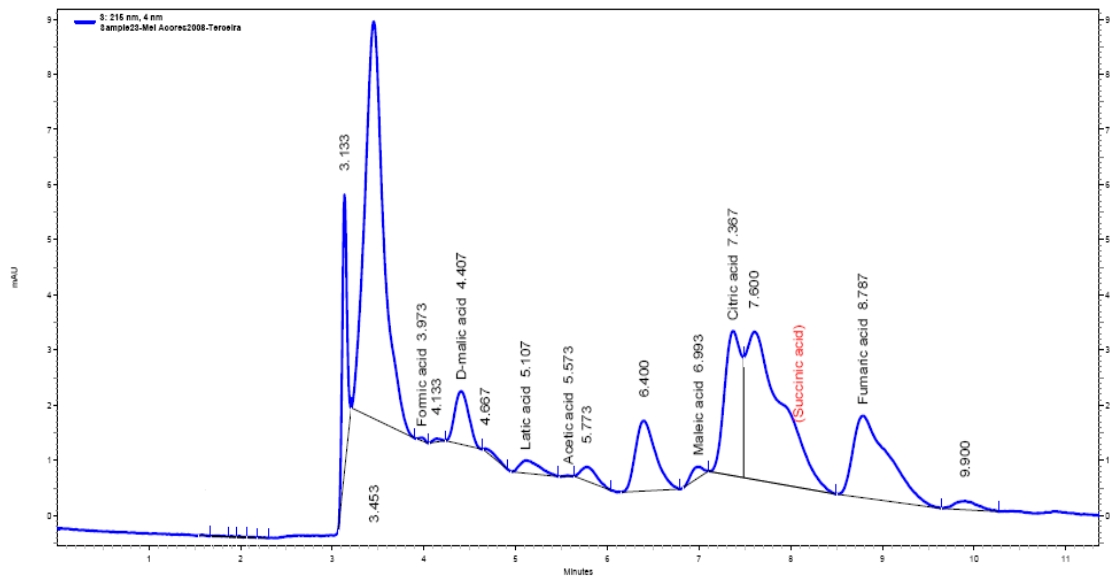
A curva de calibração foi determinada com 7 concentrações diferentes de uma mistura das soluções padrão dos ácidos orgânicos, e cada concentração foi determinada em

triplicado. Os gráficos foram obtidos por regressão linear da concentração vs altura dos picos (Figura 7).

Na Figura 8 está representado um cromatograma equivalente à mistura da concentração stock dos ácidos orgânicos analisados (A) e um cromatograma de uma amostra (B).



A



B

Figura 8 – Cromatogramas representativos: A) Mistura de soluções padrão dos ácidos orgânicos analisados (ácido fórmico, D-málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico e fumárico); B) Amostra de mel da Ilha Terceira.

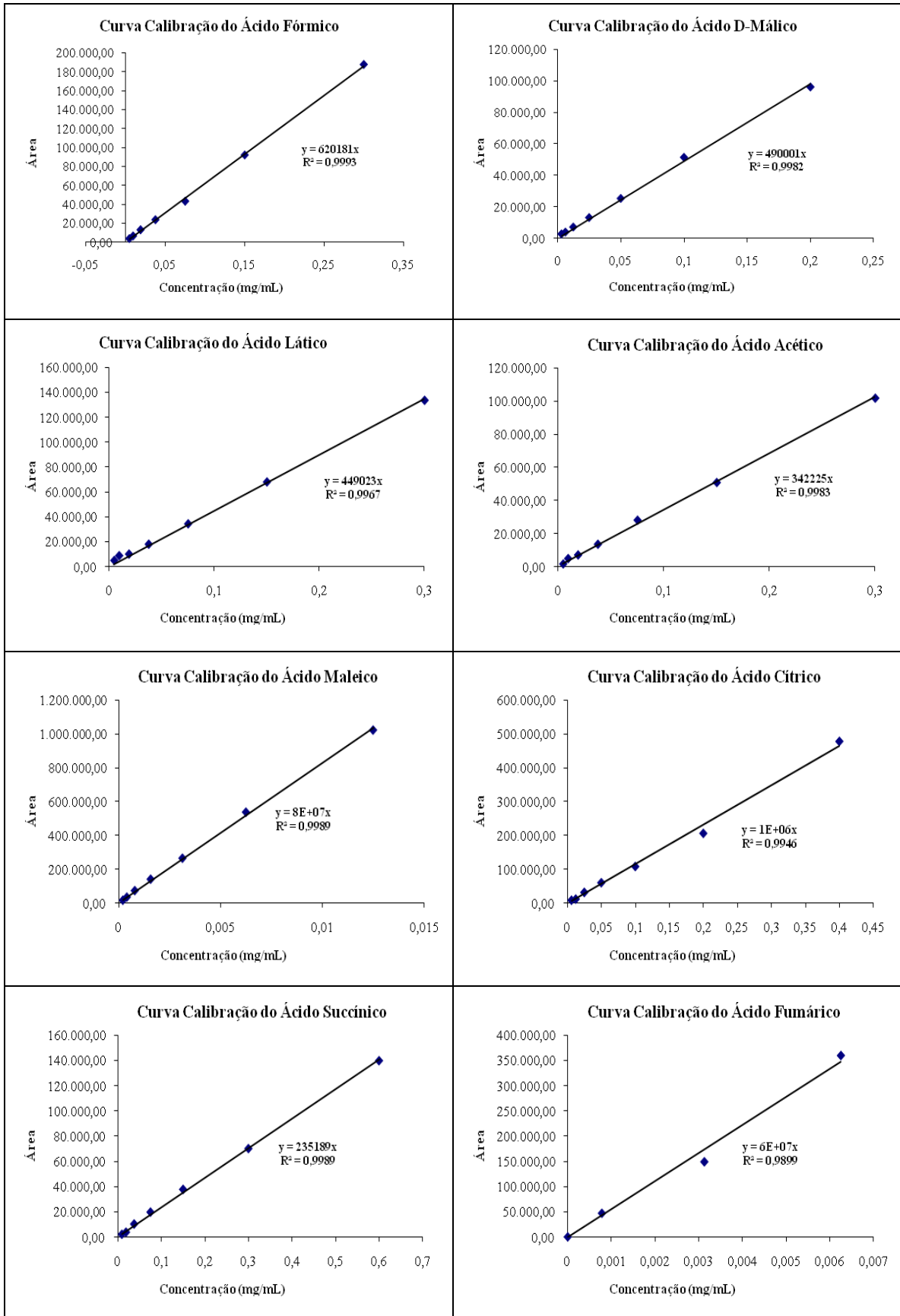


Figura 7 – Curva de calibração dos ácidos fórmico, D-Málico, Láctico, Acético, Maleico, Cítrico, Succínico e Fumárico*. * Na curva de calibração do ácido fumárico eliminaram-se as três diluições mais baixas.

A concentração de cada ácido orgânico nas amostras foi calculada através da curva de calibração de cada ácido, onde o eixo das ordenadas corresponde à área determinada pelos picos no cromatograma do HPLC, e o eixo das abcissas corresponde à concentração, expressa em mg/ml. Posteriormente, determinou-se a concentração expressa em mg/kg de mel, na qual se multiplicou a concentração determinada pela curva de calibração por 4, referente aos 4 ml de ácido sulfúrico que se utilizou para eluir os ácidos orgânicos das amostras de mel e por 1000 g, o resultado foi dividido por 0,75 g, correspondentes à diluição efectuada do mel (7,5 g para 100 ml de H₂O, do qual se retirou 10 ml), ou seja:

$$\text{Ácido orgânico} \left[\frac{4 \times \left[\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right] \times 1000}{0,75} \right] \left(\frac{\text{ng}}{\text{Kg mel}} \right)$$

Determinou-se também o ácido D-glucónico, uma vez que este poderá ser determinante na actividade antibacteriana. Para tal utilizou-se um Kit enzimático UV D-Gluconic acid/D-glucono- δ -lactona (Boehringer-Mannheim, Roche) que nos permite determinar a quantidade total de ácido glucónico por espectrofotometria UV a 340 nm. Para tal pesou-se 2,5g de mel, dissolveu-se em 50 ml de Milli-Q H₂O e ajustou-se o pH para aproximadamente 10,5 com 0,1 N KOH (Merck). A mistura foi agitada durante 10 min e de seguida ajustou-se o pH para 7,8 com 0,1 N ácido clorídrico (HCl) (Merck). A mistura foi transferida para um frasco volumétrico de 100 ml e ajustou-se o volume com Milli-Q H₂O. Transferiu-se 10 ml da mistura anterior para um novo frasco de 100 ml e ajustou-se o volume com Milli-Q H₂O. Para a medição espectrofotométrica numa cuvette adicionou-se 0,4 ml de solução tampão (tampão trietanolamina, pH 7.8, 60 mg de NADP, 150 mg de trifosfato de adenosina (ATP), sulfato de magnésio e estabilizadores), com 0,8 ml amostra ou água (branco) e 0,008 ml da solução de suspensão com 110 unidades de 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH) à temperatura ambiente e agitou-se, lendo-se a absorvência a 340 nm, quando estabilizado da amostra (A1) e do branco (B1). De seguida iniciou-se a reacção adicionando-se 0,008 ml da solução de suspensão com 13 unidades de gluconato cinase, agitou-se e esperou-se entre 5 a 10 min, de forma a completar a reacção, de seguida leu-se a absorvência da amostras (A2) e do branco (B2). As medições foram efectuadas num espectrofotómetro.

Assim, a absorvência foi determinada pela diferença entre as absorvências das amostras subtraindo a diferença das absorvências do branco, ou seja:

$$\Delta A = (A2 - A1) - (B2 - B1)$$

A determinação da concentração de ácido D-glucónico, foi efectuada segundo o kit, e calculada pela seguinte fórmula (Mato *et al.*, 1997):

$$\frac{\text{AcidoD-Gluconic(g)}}{\text{Mel(Kg)}} = \frac{47,31}{\text{pesoAmostra (g)}} \times \Delta A$$

O factor 47,31 veio da equação seguinte:

$$47.31 = \frac{V \times M}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \frac{100}{1000} \times \frac{100}{10} \times 1000$$

Onde $V = 1,216$ é o volume final da reacção em ml, $M = 196,1$ é a massa molar do ácido D-Glucónico, $\epsilon = 6,3$ é o coeficiente de absorção do NADH a 340 nm ($\text{Lxmmol}^{-1}\text{xcm}^{-1}$), $d = 1$ é a distância em cm, $v = 0,800$ é o volume da amostra em ml, 1000 é ml num litro, 100/1000 corresponde ao peso em g de ácido D-glucónico em 100 ml de solução final, 100/10 é o factor de diluição e 1000 são g num kg. A concentração do ácido D-glucónico é determinada directamente pela extinção do coeficiente NADPH.

3.2.5 Determinação do Índice de Fenol

Para a determinação do índice de fenol utilizou-se o método descrito por Andrade *et al.*, 1997, através do método de Folin-Ciocalteu. Este método fundamenta-se numa reacção de oxidação-redução entre os polifenóis e o reagente de Folin da qual resulta um complexo de cor azul que ao absorver radiação a 765 nm permite a quantificação dos compostos fenólicos. Para a extracção dos fenóis totais utilizou-se uma cromatografia de troca iónica com um polímero absorvente, a Amberlite® XAD®-2 (Supelco). Este polímero é uma resina hidrofóbica com ligações cruzadas de poliestireno. Esta resina é muito utilizada para absorver compostos orgânicos solúveis de amostras aquosas ou solventes orgânicos.

Para a extracção dos fenóis do mel diluiu-se 4 g de mel com água (1:5), ajustou-se o pH para 2 com HCl e filtrou-se com algodão de forma a remover quaisquer partículas sólidas. Ao filtrado adicionou-se 6 g de resina Amberlite XAD-2 e agitou-se com um agitador magnético por 10 minutos, para que a Amberlite pudesse absorver a maior quantidade de fenóis possível. De seguida, esta mistura foi colocada numa coluna cromatográfica de vidro 10 x 1,5 cm, a qual se lavou com 20 ml de água acidificada com HCl a pH 2 e posteriormente com 25 ml de água destilada, de forma a eluir os compostos polares. Os fenóis totais das amostras de mel que ficaram, deste modo, retidos da coluna, foram eluídos com 30 ml de metanol, sendo posteriormente evaporados num rotavapor (Rotavapor-RE111,

Büchi 461 Water Bath da Sotel) a 40 °C, sob vácuo. O resíduo final foi diluído em 1 ml de metanol, de forma a proceder-se a determinação do índice de fenol.

Ao extracto (20 µL) adicionou-se 1,58 ml de água destilada e 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Merck), e após 5 minutos, adicionou-se 300 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio anidro (Merck, Ref. 6392.0500, Na₂CO₃). Deixou-se repousar a mistura a temperatura ambiente durante 2 horas e procedeu-se à leitura espectrofotométrica das amostras a 765 nm. Para a realização da curva de calibração utilizou-se diferentes concentrações de ácido gálico (Ácido Gálico monohidrato, 98%, Sigma-Aldrich, Ref. 398225) (50 – 500 mg/L), representado na Figura 9. O cálculo do teor em fenóis foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico (GAE) / 100 g de mel.

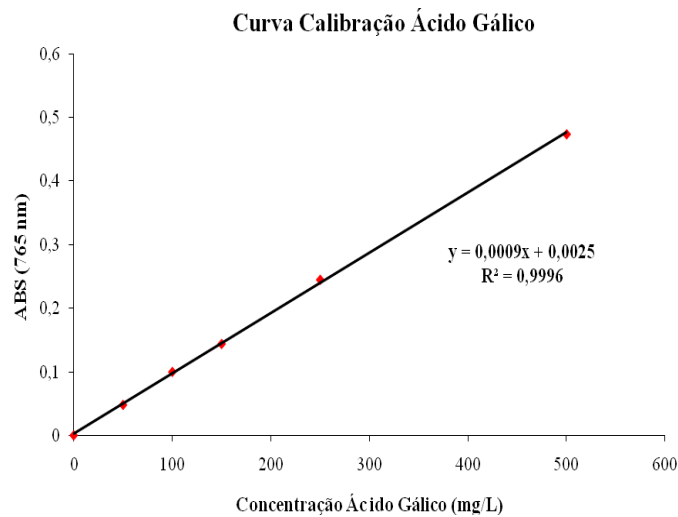


Figura 9 – Curva de calibração do ácido Gálico, para determinação do índice de fenol.

3.3 ANÁLISE POLÍNICA

Para a análise polínica utilizou-se um método descrito por Andrade *et al.* (1999), onde todas as amostras foram submetidas a acetólise. A determinação da origem botânica das amostras foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Louveaux *et al.* (1978).

O procedimento para a análise polínica do mel foi a seguinte: pesou-se 10g de mel e dissolveu-se em 50 ml de água destilada quente (40°C). Distribuiu-se por tubos de centrífuga e centrifugou-se duas vezes a 2500 g durante 10 min. De seguida descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 5 ml de ácido acético glacial e centrifugou-se a 2500 g durante 10 min e eliminou-se o sobrenadante. Ao *pellet* adicionou-se 10 ml de solução de acetólise (1 ml ácido sulfúrico e 9 ml ácido acético anidro), o qual se colocou num banho a

100°C durante 3 min. De seguida, centrifugou-se e adicionou-se ao *pellet* 10 ml de glicerina 50%, centrifugando-se de seguida. Por fim, colocou-se o *pellet* numa estufa a 45°C durante 2 dias e adicionou-se ao *pellet* 0.5 ml de glicerina/gelatina. Posteriormente, 0.1 ml destas amostras foi colocado numa lâmina, para posterior análise ao microscópio.

A análise qualitativa, ou seja, a análise polínica que determina a percentagem de cada espécie ou tipo polínico relativamente o total de grãos contados (Louveaux *et al.*, 1978), foi realizada por meio da contagem de 300 a 500 grãos de pólen por amostra recorrendo ao microscópio óptico com câmara fotográfica acoplada. Este processo foi realizado com a objectiva de 40x, tendo sido tiradas fotografias de cada área para posterior contagem dos grãos de pólen. Os grãos sem expressão numérica, inferior a 1% do total de grãos, não foram identificados e foram designados como "outros géneros polínicos". Foram então determinadas as percentagens desses grãos de pólen e definidas as seguintes classes de frequência: pólen dominante (> 45%), pólen acessório (15-44%), pólen isolado importante (3-14%) e pólen isolado ocasional (< 3%) (Barth, 1970; Louveaux *et al.*, 1978).

Considera-se mel monofloral, o que contém pólen com uma representação superior a 45%. Para a análise polínica foi calculada o índice de dominância (D), normalmente utilizada em ecologia:

$$D = \frac{N_{máx1} + N_{máx2}}{n}$$

onde, $N_{máx1}$ corresponde ao nº de grãos de pólen do tipo mais frequente, $N_{máx2}$ ao nº de grãos de pólen do segundo tipo mais frequente e n o nº total de grãos de pólen.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação da actividade antioxidante utilizaram-se dois métodos espectrofotométricos, actividade antiradical - DPPH (Brand-Williams, *et al.*, 1995) e actividade antioxidante total - FRAP (Benzie and Strain, 1996).

3.4.1 DPPH

Este método baseia-se na medição do decréscimo da absorvência a 517 nm do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH - Sigma-Aldrich, Ref. D9132-1g). Este radical possui uma coloração violeta, que na presença de uma substância doadora de hidrogénio, é reduzido, perdendo essa coloração (Figura 10) (Brand-Williams *et al.*, 1995).

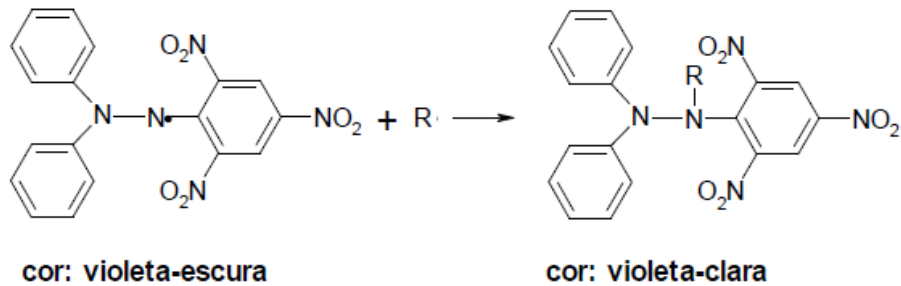


Figura 10 - Demonstração da estabilização do radical livre DPPH a) Radical Livre DPPH b) Forma não radical do DPPH

As amostras de mel foram diluídas em água quente para uma concentração de 0,1 g/ml (10%) em solução ácido oxálico 5% (Ácido Oxálico Dihidratado 99+%, Sigma, Ref. O0376), à qual se retirou 0,75 ml e adicionou-se 1,5 ml de DPPH em metanol na concentração de 0,1 mg/ml. Foi realizado um branco com 0,75 ml amostra de mel com 1,5 ml metanol de forma a eliminar a interferência da cor do mel.

Os resultados foram expressos em micro-equivalentes de antioxidante por mg de mel ($\mu\text{eq}/\text{mg}$), tendo em conta que 1 μeq de antioxidante corresponde à capacidade de redução de uma micromole de um pró-oxidante (Aljadi and Kamaruddin, 2004).

A mistura foi deixada em repouso durante 5 minutos no escuro, e posteriormente foi lida a absorvência num espectrofotómetro. Realizou-se uma curva de calibração utilizando ácido ascórbico (L+) Ácido Ascórbico, Riedel-de Haën, Ref. 33034) em concentrações compreendidas entre 0 e 0,03 mg/ml (Figura 11).

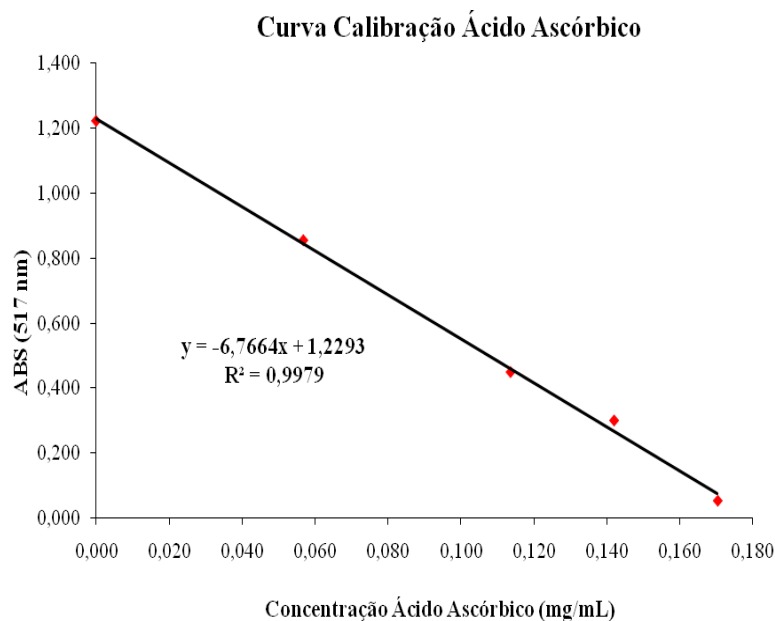


Figura 11 - Curva Calibração do ácido ascórbico, para determinação do DPPH.

3.4.2 Poder Antioxidante pela Redução de Ferro (FRAP)

A redução do par $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ para determinar o poder antioxidante (FRAP) foi desenvolvido por Benzie e Strain (1996) e modificado pelos mesmos autores em 1999, como um método directo para medir o poder antioxidante total de fluidos biológicos. O princípio deste método é baseado na redução de um complexo ferro-2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} -TPTZ), que tem uma coloração azul, aos sais ferrosos, que na presença de antioxidantes a pH baixo forma outra cor (Fe^{2+} -TPTZ).

Efectuou-se uma curva de calibração com sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) entre as concentrações de 0 e 1 mmol/L. A solução de FRAP foi obtida adicionando 25 ml tampão acetato 300 mmol/L a pH 3,6 com 2,5 ml TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) (10mmol/L) em HCl (40 mmol/L) e 2,5 mL de cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (20 mmol/L). As amostras foram diluídas para 10%. Para a análise das amostras adicionou-se 1500 μL FRAP aquecido a 37°C (medição 1) com 50 μL amostra e 150 μL água. De seguida, mediu-se a absorvência a 593 nm da redução do ferro a cada 15 segundos, num período de 5 minutos. Efectuou-se um branco com 1500 μL FRAP e 200 μL água. Os resultados são expressos e em μM Fe (II) para as amostras diluídas a 10%.

Na Figura 12 está representada uma curva de calibração típica utilizada na medição do FRAP.

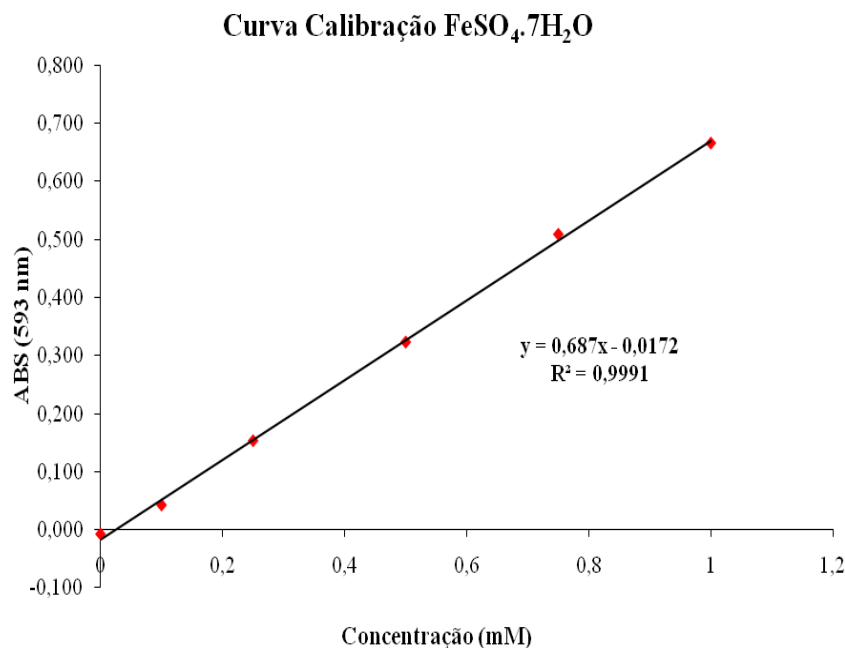


Figura 12 - Curva Calibração de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, para determinação do FRAP.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

Pretendeu-se determinar a actividade antimicrobiana das amostras de mel contra duas estirpes de *S. aureus* (bactéria *Gram*-positiva), uma pertencente à colecção da Universidade dos Açores, de origem bovina (3DA) e uma de referência ATCC9144 (2LaQ).

A actividade antimicrobiana das amostras de mel foi determinada pelo método de difusão em agar (Well-assay test), utilizando fenol como padrão (Allen *et al.*, 1991a e b). Foram efectuados quadruplicados de cada amostra, adicionando 100 µl de mel em cada poço e utilizando-se água destilada esterilizada como branco.

Para a preparação do inoculo a cultura foi colocada em meio Brain Heart Infusion (BHI, Merck) e incubada a 37°C durante 18h. Realizaram-se repicagens em BHI para manter as culturas frescas (100 µl inoculo em caldo de BHI para 5 ml de caldo BHI fresco). Efectuou-se a verificação da pureza das culturas através de preparações coradas pelo método de *Gram* e observação de colónias uniformes em Agar Nutritivo (15 g/L agar agar com 13 g/L nutrient broth, pH 7,4±0.2, Merck) (Fortuna, 2006).

As culturas de trabalho foram obtidas fazendo um diluição de 1:10 (9 ml de BHI + 1 ml de inoculo) das culturas frescas, resultando numa densidade celular de $6,7 \times 10^8$ UFC/ml para a 2LaQ e de $1,3 \times 10^9$ UFC/ml para a 3DA. Posteriormente, adicionou-se 0,1 ml de cultura por cada 150 ml de BHIA (Merck) arrefecido até aos 45°C e semeou-se as placas de Petri (Ø 80mm× 12mm) por incorporação com o *S. aureus*. Deixou-se arrefecer as placas a 4°C durante a noite e fizeram-se poços no agar com cerca de 0,6 mm de diâmetro com uma pipeta de Pasteur. O fundo dos poços foi coberto com uma gota de Agar-agar a 15% (Merck) para evitar a infiltração das amostras de mel entre o meio de cultura e o fundo da placa, de forma a eliminar falsos positivos.

As amostras de mel foram diluídas para 10%, 25% e 50% (p/v) utilizando água destilada esterilizada. Utilizou-se também o mel puro (100%).

De seguida, 100 µL de cada diluição foram colocados nos poços, e as placas foram incubadas numa estufa (Memmert, Modell 100-800), sem inversão, durante 18h a 37°C.

Posteriormente, efectuou-se a medição dos diâmetros das zonas de inibição com o auxílio de uma craveira digital (Absolute Digimatic Caliper, Mitutoyo 500-161U, Inglaterra), medindo dois diâmetros perpendiculares. Efectuou-se a média e subtraiu-se o diâmetro do poço (6 mm) (Figura 13).

Para a curva de calibração utilizou-se o índice de fenol (Figura 14). Para tal, prepararam-se várias diluições de fenol (Merck, C₆H₅OH, min 99,5%), 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% e 20% (p/v) em água destilada. Estas soluções foram colocadas nos poços e incubadas a 37°C durante 18h, para determinação dos respectivos halos de inibição.

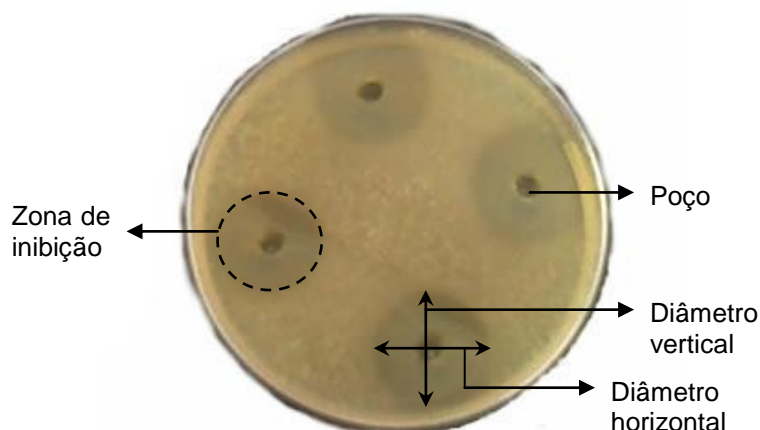


Figura 13 - Medição dos halos de inibição.

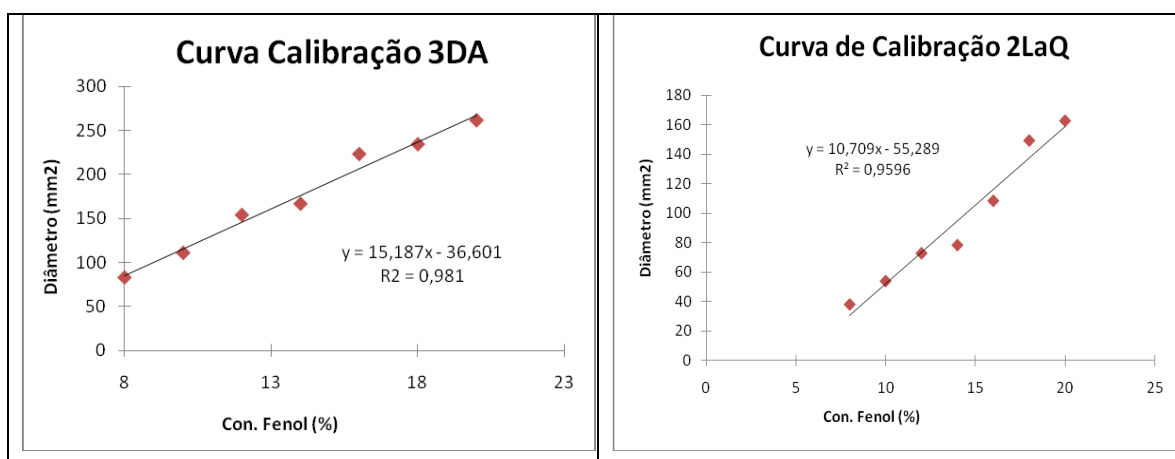


Figura 14 - Curvas padrão de fenol utilizadas para avaliar a actividade antimicrobiana do mel, para as duas estirpes estudadas, 3DA e 2LaQ.

Para avaliar o efeito da adição de catalase, preparou-se uma solução 10 mg/ml de catalase de fígado bovino (Catalase (EC1.11.1.6), Sigma) em água destilada e efectuaram-se diluições de mel em catalase (25 e 50%). Antes da sua aplicação nas placas, as amostras foram colocadas durante 10 minutos em gelo para parar a reacção.

Avaliou-se também o efeito da neutralização do mel, em amostras diluídas para 25 e 50%, para a qual utilizou-se uma solução de NaOH 1 N, para ajustar o pH para 7 ± 0.1 com a ajuda dum potenciómetro (Nahita, Modelo Nº 925, pH Metter).

O índice de fenol foi calculado com base no quadrado dos diâmetros de inibição obtidos para cada amostra e nos diâmetros de inibição obtidos com as soluções padrão de fenol. A actividade antimicrobiana foi expressa como índice de fenol, que corresponde à concentração da solução de fenol que seria necessária para que se obtivesse um valor do quadrado do diâmetro de inibição igual ao da amostra.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicado e os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). Foram efectuadas correlações entre o conteúdo total em fenol e a actividade antioxidante (FRAP e DPPH) e entre a cor e o conteúdo total em fenol e a cor e a actividade antioxidante (FRAP e DPPH). Procedeu-se também à eliminação dos *outliers*, pelo método não-paramétrico (1-Sample Kolmogorov-Smirnov), através do SPSS.

De forma a identificar os grupos em cada região relacionados com o conteúdo em ácidos orgânicos e com a sua identificação polínica, foi realizada uma análise multivariada de agrupamento, através do programa estatístico Community Analysis Package 4 (CAP4). Para esta análise, calculou-se a proporção de cada ácido orgânico em função da concentração total dos ácidos, em cada amostra de mel. Os valores em percentagem foram transformados (raiz quadrada do arcsen) e foi aplicado o algoritmo da ligação usando a distância média euclidiana. Foram analisadas 27 amostras e os grupos foram identificados no ponto médio do intervalo de distância euclidiana de dissimilaridade usando um dendrograma. Para analisar a variabilidade subjacente e para identificar associações vantajosas para os diferentes grupos de mel, foi executada uma análise ao componente principal (PCA). Foi realizado o mesmo procedimento para a análise polínica, transformando-se os dados da mesma forma.

Para a análise de clusters e PCA, utilizando as variáveis físico-químicas estudadas, normalizaram-se os dados obtidos (aos dados foi subtraído o valor da média e dividido pelo desvio padrão). Efectuou-se também uma análise de clusters e PCA para avaliar o efeito da diluição, da catalase e da neutralização do pH na actividade antimicrobiana das diferentes amostras de mel.

A Regressão Linear Múltipla com selecção de variáveis *stepwise*, foi utilizada para obter um modelo parcimonioso que permitisse prever os valores de pH em função da concentração dos diferentes ácidos orgânicos analisados. Igualmente foi realizada a regressão linear múltipla com selecção de variáveis *stepwise* para prever os valores das seguintes variáveis: pH, a_w , fenóis e ácidos glucónico e cítrico, em função da variável independente (pólen). Analisaram-se os pressupostos do modelo nomeadamente o da distribuição normal, homogeneidade e independência dos erros. Os dois pressupostos foram validados graficamente e o pressuposto da independência foi validado com a estatística de Durbin-Watson ($d = 1.68$) (Maroco, 2007). Todas as análises foram efectuadas com o SPSS (V. 17, SPSS Inc.) e, em anexo, apresentam-se os *outputs* do *software*. Considerou-se para todas as análises uma probabilidade de erro tipo I (α) de 0.05.

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POLÍNICA DO MEL

4.1.1 Actividade da Água (a_w)

No Quadro 5 estão indicados os valores obtidos para a actividade da água das amostras de mel analisadas.

Quadro 5 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para a_w . Os valores indicados representam a média \pm SEM, de três determinações.

NOME	REGIÃO	a_w
Mel Quinta do Além	S. Miguel (Fajã de Cima)	0,628 \pm 0,000
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	0,627 \pm 0,000
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	0,626 \pm 0,000
Mel Cores	S. Miguel	0,616 \pm 0,000
Apiário Beatriz Afonso	S. Miguel (Ribeira Grande)	0,619 \pm 0,000
Apiário Paulo Pavão	S. Miguel	0,617 \pm 0,000
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	0,605 \pm 0,001
Mel Quintal dos Açores (3)	S. Miguel (Candelária)	0,600 \pm 0,006
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	0,604 \pm 0,002
Mel Flor de Incenso	Pico	0,556 \pm 0,002
Mel dos Açores (1)	Terceira	0,620 \pm 0,001
Apiário Paulo Sousa	Terceira	0,632 \pm 0,000
Mel dos Açores (2)	Terceira	0,608 \pm 0,000
Mel dos Açores (3)	Terceira	0,619 \pm 0,000
Mel dos Açores (4)	Terceira	0,573 \pm 0,001
Mel dos Açores (5)	Terceira	0,548 \pm 0,001
Mel dos Açores (6)	Terceira	0,565 \pm 0,000
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	0,574 \pm 0,001
Mel Serras do Algarve	Algarve	0,592 \pm 0,000
Mel Vinhais Trás-os-Montes	Trás-os-Montes	0,593 \pm 0,001
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	0,614 \pm 0,001
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	0,595 \pm 0,000
Mel Natural	Austrália	0,601 \pm 0,001
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	0,623 \pm 0,001
Mel Orgânico (1)	Argentina	0,593 \pm 0,001
Mel Orgânico (2)	Argentina	0,614 \pm 0,001
Mel Orgânico (3)	Argentina	0,554 \pm 0,003

Ao analisarmos os valores obtidos para a actividade da água podemos observar que o mel proveniente do Apiário Paulo Sousa, da Ilha Terceira, foi o que apresentou valor mais elevado ($0,632 \pm 0,001$) e o Mel dos Açores (5), também da Ilha Terceira, foi o que apresentou o valor mais baixo ($0,548 \pm 0,001$). O mel da Nova Zelândia apresentou valor semelhante aos méis provenientes da Ilha de São Miguel.

O conteúdo de água do mel depende de vários factores, como por exemplo, da época da colheita, do grau de maturação do mel alcançado na colmeia e de factores climáticos. A actividade da água é ainda determinada pela presença de monossacáridos, enquanto os dissacáridos têm uma pequena influência no seu valor (Zamora *et al.*, 2006).

Considerando que a glucose é menos solúvel em água do que a frutose, a glucose do mel é a principal causa para a cristalização do mel, pela formação da glucose monohidratada, libertando outras moléculas de água. Além disso, esta cristalização reduz a concentração de solutos na fase líquida e assim, aumenta a actividade da água. (Abramovic *et al.*, 2008). Desta forma, a cristalização do mel pode reflectir-se num aumento da actividade da água.

4.1.2 pH

No Quadro 6 estão indicados os valores de pH para cada amostra de mel analisada. O pH dos méis analisados (27 amostras) variou de 3,06 (Apiario Paulo Sousa da Ilha Terceira) a 4,40 (Mel Orgânico (3) da Argentina), pelo que se encontra dentro dos limites propostos (3,2 – 4,5) por Sato and Miyata, 2000.

Verificou-se que os méis Açorianos (São Miguel, Pico e Terceira), os méis da Nova Zelândia e do Alentejo tendem a ter valores de pH mais baixos (entre 3,1e 3,6), quando comparados com as outras regiões (Norte de Portugal, Algarve, Austrália e Argentina) (entre 3,7 e 4,4). Desta forma, é possível que o baixo pH desempenhe um papel importante na actividade antimicrobiana das amostras de mel analisadas.

Quadro 6- Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores de pH.

NOME	REGIÃO	pH
Mel Quinta do Além	S. Miguel (Fajã de Cima)	3,12
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	3,25
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	3,21
Mel Cores	S. Miguel	3,25
Apiário Beatriz Afonso	S. Miguel (Ribeira Grande)	3,40
Apiário Paulo Pavão	S. Miguel	3,50
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	3,60
Mel Quintal dos Açores (3)	S. Miguel (Candelária)	4,00
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	3,27
Mel Flor de Incenso	Pico	3,80
Mel dos Açores (1)	Terceira	3,24
Apiário Paulo Sousa	Terceira	3,06
Mel dos Açores (2)	Terceira	3,20
Mel dos Açores (3)	Terceira	3,30
Mel dos Açores (4)	Terceira	3,50
Mel dos Açores (5)	Terceira	4,06
Mel dos Açores (6)	Terceira	3,91
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	3,58
Mel Serras do Algarve	Algarve	3,71
Mel Vinhais Trás-os-Montes	Trás-os-Montes	4,10
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	4,20
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	4,09
Mel Natural	Austrália	3,90
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	3,53
Mel Orgânico (1)	Argentina	4,10
Mel Orgânico (2)	Argentina	4,00
Mel Orgânico (3)	Argentina	4,40

4.1.3 Cor

No Quadro 7 estão indicados os valores de intensidade da cor (mAU) das 27 amostras de méis analisadas. Verificou-se que a absorvência da solução de mel a 50% (p/v) variou de $70,7 \pm 0,001$ (Mel dos Açores (5) da Ilha terceira) a $1793,3 \pm 0,001$ (Active Manuka Honey da Nova Zelândia).

Podemos verificar que os méis que apresentaram uma coloração mais escura foram os da Nova Zelândia e Serra do Caramulo e os mais claros eram provenientes da Ilha Terceira, Pico, Algarve e Alentejo. Esta diferença da cor tem relação directa com a origem botânica, maneiço, processamento e armazenamento, como por exemplo pela cera, que escurece com o tempo de armazenamento ou pelas reacções de *Maillard* e com a temperatura na qual o mel amadurece na colmeia.

Quadro 7 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel analisadas e respectivos valores obtidos para a cor. Os valores indicados representam a média \pm SEM de três determinações.

NOME	REGIÃO	COR mAU, 50% p/v
Mel Quinta do Além	S. Miguel (Fajã de Cima)	296,7 \pm 0,001
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	745,0 \pm 0,002
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	267,3 \pm 0,015
Mel Cores	S. Miguel	363,3 \pm 0,000
Apiário Beatriz Afonso	S. Miguel (Ribeira Grande)	586,3 \pm 0,001
Apiário Paulo Pavão	S. Miguel	569,3 \pm 0,000
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	1096,0 \pm 0,062
Mel Quintal dos Açores (3)	S. Miguel (Candelária)	526,7 \pm 0,002
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	891,3 \pm 0,001
Mel Flor de Incenso	Pico	95,3 \pm 0,001
Mel dos Acores (1)	Terceira	259,0 \pm 0,001
Apiário Paulo Sousa	Terceira	267,3 \pm 0,001
Mel dos Açores (2)	Terceira	388,7 \pm 0,001
Mel dos Açores (3)	Terceira	832,3 \pm 0,001
Mel dos Açores (4)	Terceira	95,3 \pm 0,000
Mel dos Açores (5)	Terceira	70,7 \pm 0,001
Mel dos Açores (6)	Terceira	422,0 \pm 0,001
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	258,3 \pm 0,004
Mel Serras do Algarve	Algarve	204,0 \pm 0,001
Mel Vinhais Trás-os-Montes	Trás-os-Montes	1107,3 \pm 0,001
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	1647,0 \pm 0,007
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	1533,7 \pm 0,001
Mel Natural	Austrália	394,0 \pm 0,002
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	1793,3 \pm 0,001
Mel Orgânico (1)	Argentina	779,7 \pm 0,001
Mel Orgânico (2)	Argentina	955,3 \pm 0,001
Mel Orgânico (3)	Argentina	379,7 \pm 0,001

4.1.4 Ácidos Orgânicos

No Quadro 8 estão indicados os valores de concentração para os ácidos orgânicos determinados por HPLC, para as 27 amostras de méis analisadas. Os resultados dos ácidos orgânicos foram representados em mg/kg de mel para os ácidos quantificados por HPLC (ácidos fórmico, D-málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico e fumárico) e em g/kg de mel para o ácido D-glucónico.

O ácido fórmico foi apenas detectado em amostras originárias da Austrália (97,66 mg/kg mel e 31,71 mg/kg mel), Nova Zelândia (1,24 mg/kg mel) e numa amostra da Ilha Terceira (Mel dos Açores (6) - 8,08 mg/kg mel). Este resultado pode dever-se à sua possível utilização no tratamento contra a *Varroa destructor*.

Quadro 8 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para os ácidos orgânicos (mg/kg mel). Os valores indicados representam a média de três determinações. nd - não determinado

Nome	Ác. Fórmico	Ác. D-Málico	Ác. Láctico	Ác. Acético	Ác. Maleico	Ác. Cítrico	Ác. Succínico	Ác. Fumárico
Mel Quinta do Além	nd	nd	1480,87	989,36	nd	1553,05	8785,19	nd
Mel Jubileu	nd	nd	1573,10	354,12	nd	908,65	561,60	nd
Mel Quintal dos Açores (1)	nd	nd	1382,74	643,93	1,92	967,95	3258,54	nd
Mel Cores	nd	nd	893,61	538,10	nd	2174,09	nd	nd
Apiário Beatriz Afonso	nd	nd	nd	54,41	nd	nd	nd	nd
Apiário Paulo Pavão	nd	161,23	86,47	1415,09	nd	959,27	nd	0,45
Mel Quintal dos Açores (2)	nd	74,15	2237,54	nd	0,28	nd	nd	15,88
Mel Quintal dos Açores (3)	nd	nd	638,23	24940,11	1,55	134,03	nd	1,53
Mel Flor Silvestre	nd	nd	2416,95	283,32	nd	718,55	nd	nd
Mel Flor de Incenso	nd	21,17	402,78	20410,33	0,22	361,23	nd	nd
Mel dos Açores (1)	nd	nd	nd	95,54	nd	nd	nd	nd
Apiário Paulo Sousa	nd	nd	nd	36,04	nd	5,57	nd	nd
Mel dos Açores (2)	nd	nd	nd	78,53	0,72	720,71	nd	10,87
Mel dos Açores (3)	nd	15,79	nd	2160,85	0,02	5,78	nd	4,47
Mel dos Açores (4)	nd	nd	1158,49	23121,94	0,61	237,50	nd	2,41
Mel dos Açores (5)	nd	1002,86	38,79	nd	0,08	243,47	315,20	1,75
Mel dos Açores (6)	8,08	497,65	163,87	1,30	0,50	707,09	nd	17,30
Mel Pulo do Lobo	nd	nd	nd	1967,14	nd	nd	nd	nd
Mel Serras do Algarve	nd	nd	4374,42	149,87	4,72	111,55	nd	nd
Mel Vinhais Trás-os-Montes	nd	344,10	6900,59	2074,39	nd	184,62	nd	61,11
Mel Serra do Caramulo	nd	nd	1702,97	1244,06	nd	1,72	nd	11,19
Mel Quinta da Urgueira	97,66	59,29	1376,45	1029,82	nd	85,44	nd	nd
Mel Natural	31,71	158,75	284,24	12,49	1,03	195,25	922,96	0,25
Active Manuka Honey	1,24	nd	nd	98,80	0,33	nd	nd	11,67
Mel Orgânico (1)	nd	170,42	176,25	40620,75	nd	326,35	nd	53,79
Mel Orgânico (2)	nd	96,73	nd	24364,50	3,80	3991,91	nd	0,34
Mel Orgânico (3)	nd	46,52	nd	28678,13	nd	1074,40	nd	16,88

O ácido D-málico foi detectado em maior concentração em duas amostras da Ilha Terceira (Mel dos Açores (5) e (6), 1002,86 mg/kg mel e 497,65 mg/kg mel, respectivamente) e Trás-os-Montes (344,11 mg/kg mel), em concentrações intermédias em amostras da Ilha de São Miguel, Austrália e Argentina, variando entre 46,52 mg/kg mel (Mel Orgânico (3) da Argentina) e 170,42 mg/kg mel (Mel Orgânico (1) da Argentina) e em menor concentração numa amostra da Ilha Terceira (Mel dos Açores (3) - 15,79 mg/kg mel) e numa amostra da Ilha do Pico (Mel Flor de Incenso - 21,17 mg/kg mel). Este ácido não foi detectado nas amostras do Sul de Portugal (Alentejo e Algarve). Os valores mais elevados foram encontrados em méis da Ilha Terceira, considerados multiflorais, o que vai de acordo com o estudo de Mato *et al.*, 1998. Estes autores observaram maior concentração de ácido málico em méis multiflorais.

As amostras de Trás-os-Montes e Algarve apresentaram as concentrações mais elevadas de ácido láctico (6900,59 mg/kg mel e 4374,42 mg/kg mel, respectivamente) e as amostras da Ilha Terceira (excepto o Mel dos Açores (4)), da Argentina, da Nova Zelândia e Alentejo apresentaram os valores mais baixos (de 0 mg/kg mel a 176,25 mg/kg mel respectivamente). As amostras da Austrália, São Miguel, Pico e Serra do Caramulo apresentaram valores intermédios (entre 284,24 mg/kg mel e 2416,95 mg/kg mel). O Mel Quintal dos Açores (2), da Ilha de São Miguel, o Mel Flor Silvestre, da Ilha do Pico e o Mel Vinhais Trás-os-Montes apresentaram valores elevados de ácido láctico, o que poderá acontecer devido à contaminação com microrganismos. Embora sejam classificados como méis multiflorais, estes apresentam espécies polínicas diferentes, pelo que não terá sido a origem botânica a contribuir para estes valores. É de salientar que o ácido láctico é também utilizado no controlo da *Varroa*, o que poderá ter contribuído para os valores detectados.

Detectou-se o ácido acético em concentrações mais elevadas nas amostras da Argentina (média, 31,2 g/kg mel) e da Ilha do Pico (Mel Flor de Incenso - 20,4 g/kg mel), seguindo-se as ilhas Terceira (Mel dos Açores (4) - 23,1 g/kg mel) e São Miguel (Mel Quintal dos Açores (3) - 24,9 g/kg mel). O aumento deste ácido nas amostras dos Açores pode ser indicativo da sua origem floral, pois apesar de serem méis multiflorais, apresentaram predominância de Incenso e Trevo. No entanto, não se pode desprezar a hipótese da influência de microrganismo nos valores obtidos para este ácido, principalmente nas amostras da Argentina, uma vez que o tempo de armazenamento vai influenciar a quantidade deste ácido nos méis. Este ácido também pode ser utilizado como um indicador de fermentação (Mato *et al.*, 2006). As amostras que apresentavam valores mais baixos deste ácido foram duas amostras da Ilha de São Miguel (Apiário Beatriz Afonso e Mel Quintal dos Açores (2)), com valores compreendidos entre 0 mg/kg mel e 54,41 mg/kg mel, três amostras da Ilha Terceira (Apiário Paulo Sousa e Mel dos Açores (5) e (6)), com valores compreendidos entre 0 mg/kg mel e 36,04 mg/kg mel e uma amostra da Austrália (Mel

Natural) com 12,49 mg/kg mel. Todas as outras amostras variaram entre 78,53 mg/kg mel (Mel dos Açores (2)) e 2160,85 mg/kg mel (Mel dos Açores (3)), ambas da Ilha Terceira.

A amostra do Sul de Portugal (Algarve) e uma das amostras da Argentina (Mel Orgânico (2)) foram as que apresentaram maiores concentrações de ácido maleico (4,72 mg/kg mel e 3,80 mg/kg mel, respectivamente). Enquanto, que as amostras da Austrália, Argentina, Nova Zelândia e dos Açores apresentaram concentrações reduzidas (entre 0 mg/kg mel e 1,92 mg/kg mel). Nas amostras do Norte de Portugal (Trás-os-Montes e Serra do Caramulo) não se detectou este ácido. Os méis Mel Quintal dos Açores (1) e Mel Quintal dos Açores (3), ambos da Ilha de São Miguel, apresentaram valores elevados de ácido maleico, ambos com pólen predominante de incenso e trevo, pelo que esta poderá ser uma característica destas espécies polínicas.

Em relação ao ácido cítrico, uma das amostras da Argentina (Mel Orgânico (2)) e duas amostras da Ilha de São Miguel (Mel Quinta do Além e Mel Cores) apresentaram teores mais elevados (entre 1553,05 mg/kg mel e 3991,91 mg/kg mel), enquanto as outras amostras variaram entre 0 mg/kg mel (São Miguel, Pico, Terceira, Alentejo e Nova Zelândia) e 1074,4 mg/kg mel (Mel Orgânico (3) da Argentina). As amostras de Mel Cores e de Mel Quinta do Além, ambos de São Miguel, cuja caracterização polínica é monofloral de Incenso, apresentaram valores elevados deste ácido, pelo que muito possivelmente este é característico deste tipo de flora. É referido na literatura que os méis de *Thymus* spp e *tulip* contêm um elevado conteúdo em ácido cítrico (Nelson and Mottern, 1931, Nozal et al., 1998), o que pode ser esta a razão da presença deste ácido na amostra da Argentina. Infelizmente não foi possível determinar a origem florística dos méis provenientes da Argentina.

As únicas amostras que apresentaram ácido succínico foram uma amostra da Austrália (Mel Natural - 922,26 mg/kg mel), três amostras de São Miguel (Mel Quintal do Além, Mel Jubileu e Mel Quintal dos Açores (1)), que variaram entre 561,6 mg/kg mel e 8785,2 mg/kg mel e uma amostra da Ilha Terceira (Mel dos Açores (5) - 315,2 mg/kg mel). Nozal et al., 1998 observou que os valores mais elevados de ácido succínico ocorriam em méis de *Quercus* spp, embora não se tenha identificado este tipo polínico nos méis dos Açores.

Em relação ao ácido fumárico, verificou-se que as amostras do Pico e do Sul de Portugal (Alentejo e Algarve) não continham este ácido. A amostra de Trás-os-Montes e uma das amostras da Argentina (Mel Orgânico (1)) foram as que apresentaram o valor mais elevado deste ácido, 61,11 mg/kg mel e 53,79 mg/kg mel, respectivamente. Todas as outras amostras variaram entre 0 mg/kg mel e 16,88 mg/kg mel. As amostras de São Miguel e Ilha Terceira variaram em média, entre 16,5 mg/kg mel e 21,97 mg/kg mel, respectivamente.

Os Méis multiflorais apresentam valores mais elevados de ácido maleico, e baixos de ácidos fumárico, málico e cítrico, o que está de acordo com os resultados apresentados por Suárez-Luque *et al.* (2002) e Nozal *et al.* (1998). Suárez-Luque *et al.* (2002) também verificaram que os méis de *Trifolium L* sp. não continham ácidos málico e succínico e apresentavam valores baixos de ácido fumárico, o que se verificou para alguns dos méis analisados dos Açores, que continham Trevo.

A quantidade total de ácido D-glucónico encontrada nas 27 amostras de méis analisadas está representada no Quadro 9. Este ácido variou de 1,154 g/kg mel (Mel dos Açores - Fruter da Ilha terceira) a 15,892 g/kg mel (Serra do Caramulo).

Quadro 9 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para o ácido D-glucónico. Foram analisadas 27 amostras.

NOME	REGIÃO	g ácido D-gluconico Total/kg mel
Mel Quinta do Além	S. Miguel (Fajã de Cima)	6,094
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	5,412
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	7,797
Mel Cores	S. Miguel	4,504
Apiário Beatriz Afonso	S. Miguel (Ribeira Grande)	6,661
Apiário Paulo Pavão	S. Miguel	15,726
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	8,686
Mel Quintal dos Açores (3)	S. Miguel (Candelária)	3,558
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	5,715
Mel Flor de Incenso	Pico	2,612
Mel dos Açores (1)	Terceira	7,040
Apiário Paulo Sousa	Terceira	5,848
Mel dos Açores (2)	Terceira	3,690
Mel dos Açores (3)	Terceira	6,964
Mel dos Açores (4)	Terceira	1,533
Mel dos Açores (5)	Terceira	1,249
Mel dos Açores (6)	Terceira	1,192
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	4,220
Mel Serras do Algarve	Algarve	7,153
Mel Vinhais Trás-os-Montes	Trás-os-Montes	12,660
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	15,896
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	5,242
Mel Natural	Austrália	2,233
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	1,192
Mel Orgânico (1)	Argentina	1,154
Mel Orgânico (2)	Argentina	5,393
Mel Orgânico (3)	Argentina	3,312

O ácido glucónico foi quantificado em todos os tipos de méis tal como descrito por Mato *et al.* (2006). Observaram-se teores mais elevados de ácido glucónico nos méis com género polínico de *Erica* (Trás-os-Montes e Serra do Caramulo), o que foi também observado por Nozal *et al.* (1998). Segundo Nozal *et al.* (1998), os ácidos que melhor definem a origem botânica dos méis são: cítrico, pirúvico, glucónico, málico e quínico. No presente estudo, conseguiu-se identificar duas origens botânicas (*Pittosporum* e *Erica*) através dos ácidos cítrico e glucónico, respectivamente.

De um modo geral, os valores obtidos neste trabalho, para alguns dos ácidos orgânicos diferem um pouco dos referidos na literatura. Contudo, não existem estudos realizados com o mel dos Açores, pelo que se torna difícil comparar os resultados obtidos, pois os Açores possuem uma flora específica.

Todos os estudos sobre a determinação dos ácidos orgânicos nos méis foram maioritariamente efectuados em méis monoflorais (Nozal *et al.*, 2003), onde apenas uma espécie polínica irá influenciar a sua concentração, o que não é o caso da maioria dos méis estudados, no presente estudo. Outros trabalhos indicaram que os méis de *Castanea sativa* apresentavam valores muito elevadas de ácidos málico, cítrico, succínico e fumárico e que os méis de *Eucalyptus* sp. apresentavam valores muito baixos dos mesmos ácidos (Suárez-Luque *et al.*, 2002). Isto foi observado nas análises realizadas no mel de Manuka da Nova Zelândia, que também continha, na sua análise polínica, este género.

Efectuou-se uma regressão linear múltipla entre os ácidos orgânicos (variável independente) e a variáveis dependentes: pH, de forma a verificar qual a sua contribuição n baixo valor de pH apresentado nas amostra de méis analisadas. Esta permitiu identificar as variáveis Ácido Acético ($\beta = 0,600$; $t(19) = 5,427$; $p < 0,001$), Ácido D-Málico ($\beta = 0,567$; $t(19) = 5,256$; $p < 0,001$), Ácido Fórmico ($\beta = 0,436$; $t(19) = 4,013$; $p < 0,002$) e Ácido Láctico ($\beta = 0,267$; $t(19) = 2,440$; $p < 0,05$) como predictores significativos do pH, sendo o modelo final ajustado:

$$\text{pH} = 3,280 + 1,9 \times 10^{-5} \text{ Ácido Acético} + 0,001 \text{ Ácido D-málico} + 0,008 \text{ Ácido Fórmico} + 5,85 \times 10^{-5} \text{ Ácido Láctico}$$

Este modelo é altamente significativo e explica uma moderada proporção da variabilidade do pH ($F(4,19) = 16,84$; $p < 0,0001$; $R_a^2 = 0,734$). Os resultados desta análise encontram-se no anexo I.

Deste modelo podemos inferir que são os ácidos acético, D-málico, fórmico e láctico que mais contribuem para o valor de pH, embora possam existir outros factores que contribuem para o baixo valor de pH dos méis Açorianos.

4.1.5 Índice de Fenol

No Quadro 10 estão representados os valores obtidos para o índice de fenol das 27 amostras analisadas. Os valores foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por Kg de mel (mg GAE/Kg).

Quadro 10 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores do conteúdo de fenóis. Os valores indicados representam a média \pm SEM.

NOME	REGIÃO	Índice Fenóis Totais (mg GAE/kg)
Mel Quinta do Alem	S. Miguel (Fajã de Cima)	91,53 \pm 0,013
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	104,21 \pm 0,024
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	113,47 \pm 0,017
Mel Cores	S. Miguel	112,45 \pm 0,018
Apiário Beatriz Afonso	S. Miguel (Ribeira Grande)	236,20 \pm 0,005
Apiário Paulo Pavão	S. Miguel	109,68 \pm 0,013
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	136,25 \pm 0,043
Mel Quintal dos Açores (3)	S. Miguel (Candelária)	202,54 \pm 0,131
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	110,42 \pm 0,004
Mel Flor de Incenso	Pico	123,04 \pm 0,116
Mel dos Açores (1)	Terceira	98,75 \pm 0,015
Apiário Paulo Sousa	Terceira	60,60 \pm 0,004
Mel dos Açores (2)	Terceira	89,77 \pm 0,005
Mel dos Açores (3)	Terceira	113,66 \pm 0,007
Mel dos Açores (4)	Terceira	86,04 \pm 0,010
Mel dos Açores (5)	Terceira	124,21 \pm 0,056
Mel dos Açores (6)	Terceira	104,46 \pm 0,094
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	52,82 \pm 0,007
Mel Serras do Algarve	Algarve	99,31 \pm 0,019
Mel Vinhais Trás-os-Montes	Trás-os-Montes	196,94 \pm 0,003
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	355,74 \pm 0,008
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	177,50 \pm 0,008
Mel Natural	Austrália	105,88 \pm 0,016
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	319,81 \pm 0,004
Mel Orgânico (1)	Argentina	77,63 \pm 0,007
Mel Orgânico (2)	Argentina	86,63 \pm 0,006
Mel Orgânico (3)	Argentina	144,29 \pm 0,029

Verificou-se que o teor em compostos fenólicos variou expressivamente com o tipo de mel analisado, apresentando valores entre 52.82 \pm 0,012 mg GAE/kg mel (Alentejo) e 355,74 \pm 0,0014 mg GAE/kg mel (Serra Caramulo).

Os méis Açorianos apresentaram valores elevados de índice de fenóis totais, variando entre 60,60 \pm 0,004 mg GAE/kg mel (Apiário de Paulo Jorge Cota Sousa da Ilha

Terceira) e $236,204 \pm 0,005$ mg GAE/kg de mel (Apiário de Beatriz Afonso da Ilha de São Miguel). Os valores mais elevados foram dos méis provenientes da Serra do Caramulo e da Nova Zelândia ($355,74 \pm 0,008$ mg GAE/kg de mel e $319,81 \pm 0,004$ mg GAE/kg de mel), respectivamente. As amostras do Alentejo, Algarve, Austrália e Argentina apresentaram valores intermédios, entre $52,82 \pm 0,007$ mg GAE/kg de mel (Alentejo) e $177,50 \pm 0,008$ mg GAE/kg de mel (Austrália). Esta variação de valores pode atribuir-se às diferenças da origem floral, cuja predominância depende dos factores sazonais e ambientais (Al-Mamary *et al.*, 2002), uma vez que os valores mais baixos foram determinados para o mel com predominância de pólen de trevo e incenso, onde se inserem os méis dos Açores e o valor mais elevado foi para o mel da Serra do Caramulo com pólen dominante da família *Ericaceae* (urze e azálea). No entanto é difícil diferenciar os méis analisados uma vez que praticamente todos são multiflorais, o que vai influenciar a sua composição em fenóis.

Andrade *et al.* (1997a) observou uma correlação entre os ácidos fenólicos e a origem floral de méis monoflorais. Como indicado anteriormente no Capítulo II, o mel de urze de Portugal contém quatro flavonóides principais, quercetina, canferol-3-ramnopiranosídeo, miricetina-3-*o*-metil éter e *isorhamnetin-3-ramnoside* (Anklam, 1998). Foram observados outros fenóis característicos de méis monoflorais, como a hesperetina no mel de laranjeira, o canferol no mel de alecrim, a quercetina no mel de girassol, o ácido gálico do mel *Lavandula stoechas* e o ácido elágico no mel de *Erica* sp. Este último já tinha sido comprovado como sendo um marcador para a origem floral.

O conteúdo em fenóis é menor em méis monoflorais (trevo, acácia), o que vai de encontro aos resultados apresentados para os méis provenientes da Ilha Terceira, que apesar de terem sido considerados multiflorais, continham flora predominante de trevo e incenso. Estes valores aumentam em méis multiflorais, sendo os méis mais escuros os que contêm compostos fenólicos com propriedades antimicrobianas elevadas (Estevinho *et al.*, 2008). No presente estudo observou-se também, que os méis de Trás-os-Montes, Serra do Caramulo e Nova Zelândia apresentavam um índice de fenóis totais elevados e actividade antimicrobiana para a estirpe de *S. aureus* 2LaQ (conforme apresentado em 4.4, pág. 63).

As amostras de mel com coloração mais escura apresentaram um teor claramente mais elevado de compostos fenólicos comparando com as amostras de mel claro. Desta forma, efectuou-se uma regressão linear entre a cor e o conteúdo de fenol, o que revelou uma correlação moderada ($R^2 = 0,5$, $p < 0,001$), representada na Figura 15.

Embora a correlação seja significativa, esta teve um coeficiente de correlação não muito elevado, pelo que a cor não será influenciada apenas pelos fenóis, mas também devido a factores de armazenamento e maturação, como o caso da cera ou produtos da reacção de *Maillard*.

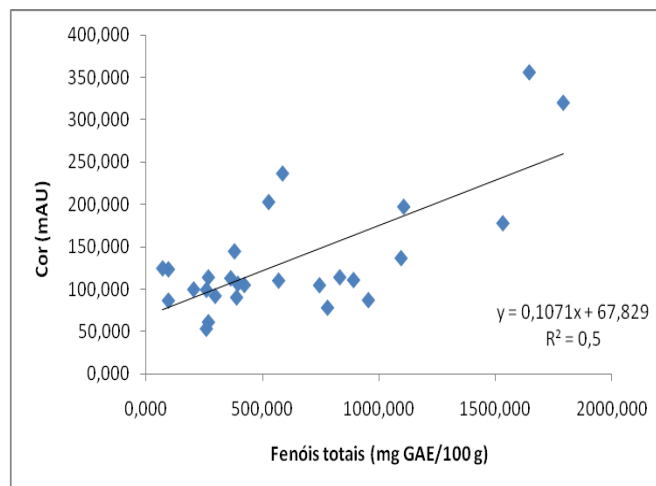


Figura 15 - Correlação entre a cor e o conteúdo em fenol das amostras de mel analisadas.

4.2 ANÁLISE POLÍNICA

Foram identificados 83 tipos polínicos das 18 amostras analisadas, os quais foram, sempre que possível, agrupados por famílias e género. O tipo polínico que não foi identificado utilizou-se a designação não identificado (NI). Efectuou-se também a determinação do Índice de dominância, que está representado no Quadro 11.

Quadro 11 - Identificação da origem geográfica, classificação e índice de dominância (D) das amostras de mel analisadas.

NOME	REGIÃO	CLASSIFICAÇÃO	ÍNDICE DOMINÂNCIA (%)
Mel Quinta do Além	S. Miguel (Fajã de cima)	Monofloral - Incenso (<i>Pittosporum</i>)	0,73
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	Multiflora (Incenso)	0,31
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	Multiflora (Incenso e Trevo)	0,27
Mel Cores	S. Miguel	Monofloral - Incenso (<i>Pittosporum</i>)	0,6
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	Multiflora (Eucalipto e Soagem)	0,35
Mel Quintal dos Açores (3)	S. Miguel (Candelária)	Multiflora (Incenso e Trevo)	0,25
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	Multiflora (Incenso e Trevo)	0,31
Mel Flor de Incenso	Pico	Multiflora (NI52 e Eucalipto)	0,5
Apiário Paulo Sousa	Terceira	Multiflora (Castanheiro e Trevo)	0,49
Mel dos Açores (2)	Terceira	Multiflora (Trevo e Eucalipto)	0,67
Mel dos Açores (3)	Terceira	Multiflora (Trevo e NI6)	0,5
Mel dos Açores (4)	Terceira	Multiflora (Trevo e Incenso)	0,58
Mel dos Açores (5)	Terceira	Multiflora (NI52 e NI10)	0,34
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	Monofloral - Soagem (<i>Echium</i> spp.)	0,96
Mel Trás-os-Montes	Trás-os-Montes	Multiflora (Urze e Azálea)	0,50
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	Multiflora (Azálea e Urze)	0,62
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	Multiflora (Eucalipto)	0,23
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	Monofloral - Trevo (<i>Trifolium repens</i> L.)	0,59

No geral, os 18 méis analisados mostraram uma elevada variedade na composição polínica. Destacam-se 12 géneros polínicos que aparecem em maior percentagem das amostras analisadas, *Pittosporum* (incenso - 94 %), *Eucalyptus* (89 %), NI6 (83 %), *Trifolium* (trevo - 83 %), *Castanea* (78 %), *Rubus* (56 %), Poaceae (56 %), *Eriobotrya* (nespereira - 50 %), *Helianthus* (50 %), *Ligustrum* (44 %), *Erica* (Urze - 44 %) e *Tibouchina* (quaresmeira - 39 %), representados na Figura 16.

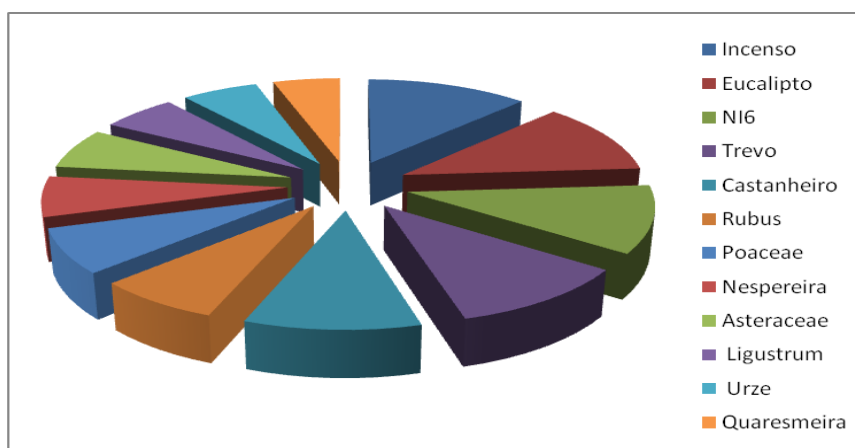


Figura 16 - Representação da percentagem de géneros polínicos, mais abundantes, nas amostras analisadas. NI - Não Identificado

Verificou-se que o Mel Quinta do Além, que indicava ser de trevo branco (*Trifolium repens*), era de incenso (*Pittosporum*). Também o Mel Cores que era rotulado como multifloral, apresentou-se como monofloral de incenso (*Pittosporum*). Em relação aos méis provenientes da ilha do Pico, são denominados DOP de monoflorais de incenso, embora se tenha verificado que eram multiflorais. O mel do Alentejo é rotulado como monofloral de rosmaninho (*Lavandula* sp), mas foi classificado como monofloral de Soagem (*Echium* spp.). Como o mel de Soagem não é valorizado pelos apicultores, estes tendem a designá-lo como mel de rosmaninho, devido à simultânea floração destas duas espécies. O mel de Trás-os-Montes era multifloral de urze e rosmaninho o que se comprovou na análise polínica. O mel de Manuka apresentava-se como Monofloral - Trevo (*Trifolium repens* L.), embora seja também colectado de uma planta originária da Nova Zelândia (*scoparium* de *Leptospermum*), que lhe confere a coloração mais escura.

Na Figura 17 e 18 está representado a frequência da composição polínica de uma amostras de mel monofloral (Alentejo) e outra multifloral (Ilha Terceira), todos os outros resultados das diferentes amostras estão apresentados no anexo II. Na análise polínica tomou-se em conta a classificação de méis proposta por Louveaux *et al.* (1978): pólen dominante (> 45%), pólen acessório (15-44%), pólen isolado importante (3-14%) e pólen isolado ocasional (< 3%).

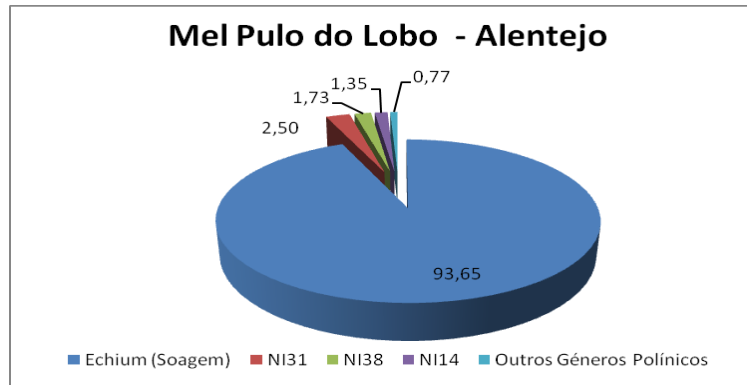
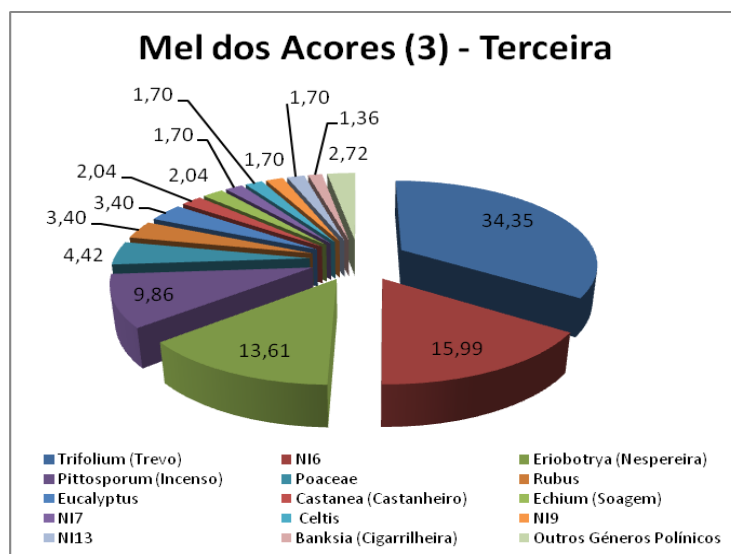


Figura 17 - Representação da percentagem de géneros polínicos mais abundantes da amostra de mel monofloral (Alentejo).



NI31 ($\beta = 0,414$; $t(10) = 8,52$; $p < 0,001$), **NI6** ($\beta = 0,253$; $t(10) = 5,66$; $p < 0,001$), **NI15** ($\beta = 0,270$; $t(10) = 6,29$; $p < 0,001$) e **Salgueiro** ($\beta = 0,214$; $t(10) = 3,797$; $p < 0,005$) como predictores significativos do pH, sendo o modelo final ajustado:

$$\text{pH} = 3,100 + 0,026 \text{Azálea} + 0,026 \text{Lingustrum} + 0,159 \text{NI56} + 0,037 \text{NI31} + 0,005 \text{NI6} + 0,064 \text{NI15} + 0,031 \text{Salgueiro}$$

Este modelo é altamente significativo e explica uma elevada proporção da variabilidade do pH ($F(7,10) = 89,21$; $p < 0,001$; $R_a^2 = 0,973$). Deste modo, podemos concluir que os géneros *Erica* (azálea), *Lingustrum*, *Salix* (Salgueiro), bem como 4 tipos polínicos não identificados (6, 15, 31, 56) contribuem significativamente para os valores de pH observados nas amostras de mel.

Para a actividade da água, a regressão linear múltipla permitiu identificar as variáveis **NI51** ($\beta = -0,738$; $t(10) = -9,995$; $p < 0,001$), **NI40** ($\beta = -0,308$; $t(10) = -4,12$; $p < 0,005$), **Lingustrum** ($\beta = -0,270$; $t(10) = -4,57$; $p < 0,01$) e **NI19** ($\beta = 0,266$; $t(10) = 3,46$; $p < 0,01$), como predictores significativos da a_w , sendo o modelo final ajustado:

$$a_w = 0.618 - 0.007 \text{NI51} - 0,003 \text{NI40} - 0,001 \text{Lingustrum} + 0,006 \text{NI19}$$

Este modelo é altamente significativo e explica uma elevada proporção da variabilidade da a_w ($F(4,10) = 47,75$; $p < 0,001$; $R_a^2 = 0,930$). Segundo este modelo o género *Lingustrum* e os tipos polínicos não identificados 40 e 51 contribuem para a diminuição da actividade da água, enquanto o tipo polínico não identificado 19 contribui para o seu aumento.

Para o ácido cítrico foi realizada a regressão linear múltipla que permitiu identificar as variáveis **NI29** ($\beta = 0,931$; $t(8) = 36,26$; $p < 0,001$), **Eucalipto** ($\beta = 0,392$; $t(8) = 13,50$; $p < 0,0001$), **NI11** ($\beta = 0,248$; $t(8) = 9,51$; $p < 0,001$), **NI15** ($\beta = -0,083$; $t(8) = -2,11$; $p < 0,1$), **Quaresmeira** ($\beta = -0,181$; $t(8) = -6,19$; $p < 0,001$), **NI42** ($\beta = 0,147$; $t(8) = 5,37$; $p < 0,005$) e **Hippohae** ($\beta = -0,092$; $t(8) = -2,39$; $p < 0,1$) como predictores significativos, sendo o modelo final ajustado:

$$\text{Ácido Cítrico} = -30,651 + 188,47 \text{NI29} + 9,002 \text{Eucalipto} + 116,2 \text{NI11} - 27,41 \text{NI15} - 34,67 \text{Quaresmeira} + 58,69 \text{NI42} - 22,86 \text{Hippohae}$$

Este modelo é altamente significativo e explica uma elevada proporção da variabilidade do ácido cítrico ($F(7,8) = 245,36$; $p < 0,001$; $R_a^2 = 0,991$). Segundo este modelo

os géneros *Eucalyptus*, *Tibouchina* e *Hippophae*, bem como 4 tipos polínicos não identificados (11, 15, 29 e 42) contribuíram para o conteúdo em ácido cítrico dos méis observados. É possível que alguns destes tipos polínicos não identificados (11, 29 e 42) possam ser do género *Thymus* spp e *tulip*, pois os méis com esta origem floral possuem um elevado conteúdo em ácido cítrico (Nelson and Mottern, 1931, Nozal et al., 1998).

A regressão linear múltipla identificou como predictores significativos do ácido glucónico, as variáveis **Azálea** ($\beta = 0,821$; $t(10) = 14,61$; $p < 0,001$), **NI39** ($\beta = -0,715$; $t(10) = -7,48$; $p < 0,001$), **NI7** ($\beta = 0,662$; $t(10) = 5,07$; $p < 0,001$), **NI18** ($\beta = -0,162$; $t(10) = -2,91$; $p < 0,05$) e **Celtis** ($\beta = -0,227$; $t(10) = -2,26$; $p < 0,05$), sendo o modelo final ajustado:

$$\text{Ácido Glucónico} = 5114,21 + 277,82 \text{ Azálea} - 3573,09 \text{ NI39} + 862,53 \text{ NI7} - 2502,70 \text{ NI18} - 398,28 \text{ Celtis}$$

Este modelo é altamente significativo e explica uma elevada proporção da variabilidade do ácido glucónico ($F(5,10) = 64,86$; $p < 0,001$; $R_a^2 = 0,955$). O género *Erica* (azálea) e o tipo polínico não identificado 17 contribuíram para o aumento da concentração em ácido glucónico nos méis estudados. Nozal *et al.* (1998) observaram que os méis com flora predominante do género *Erica* apresentavam teores de ácido glucónico mais elevados, o que está de acordo com o modelo obtido. É de salientar que os tipos polínicos não identificados 18 e 39, bem como o género *Celtis* contribuem fortemente para a diminuição do teor em ácido glucónico.

Para os fenóis, a regressão linear múltipla permitiu identificar as variáveis **Azálea** ($\beta = 0,743$; $t(9) = 15,07$; $p < 0,001$), **NI36** ($\beta = 0,714$; $t(9) = 15,09$; $p < 0,001$), **NI3** ($\beta = 0,355$; $t(9) = 7,48$; $p < 0,001$), **Acácia** ($\beta = -0,179$; $t(9) = -3,62$; $p < 0,01$), **NI5** ($\beta = 0,167$; $t(9) = 3,52$; $p < 0,01$) e **NI11** ($\beta = 0,114$; $t(9) = 2,39$; $p < 0,05$) como predictores significativos do conteúdo total em fenol, sendo o modelo final ajustado:

$$\text{Fenóis} = 9,645 + 0,54 \text{ Azálea} + 2,97 \text{ NI36} + 1,47 \text{ NI3} - 0,71 \text{ Acácia} + 0,42 \text{ NI5} + 0,78 \text{ NI11}$$

Este modelo é altamente significativo e explica uma elevada proporção da variabilidade dos fenóis ($F(6,9) = 78,996$; $p < 0,0001$; $R_a^2 = 0,969$). Deste modo, observou-se que a azálea, Acácia e 4 tipos polínicos não identificados (3, 5, 11 e 36) contribuem significativamente para o índice de fenol total observado nos méis. Como exemplo podemos referir os méis do Norte de Portugal (TM e SC) que apresentaram valores elevados de fenóis e possuíam o tipo polínico azálea como flora dominante.

4.3 ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação da actividade antioxidante utilizaram-se dois métodos distintos, o DPPH e o FRAP. O DPPH é um teste de captação de radicais, enquanto o FRAP é baseado na capacidade do antioxidante em reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} , medindo directamente os antioxidantes ou redutores de uma amostra (Beretta *et al.*, 2005).

4.3.1 DPPH

As amostras de mel analisadas apresentaram actividade antioxidante que variou entre $4,78 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq AA/mg}$ de mel (Alentejo) e $49,10 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq AA/mg}$ de mel (Trás-os-Montes). Estes valores estão apresentados no Quadro 12.

Quadro 12 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para o DPPH. Os valores indicados representam a média \pm SEM de três determinações.

NOME	REGIÃO	Concentração 10^{-4} $\mu\text{eq/mg}$
Mel Quinta do Além	S. Miguel (Fajã de cima)	14,064 \pm 0,038
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	14,586 \pm 0,032
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	12,106 \pm 0,017
Mel Cores	S. Miguel	13,784 \pm 0,065
Apiário Beatriz Afonso	S. Miguel (Ribeira Grande)	25,848 \pm 0,013
Apiário Paulo Pavão	S. Miguel	15,760 \pm 0,010
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	16,227 \pm 0,057
Mel Quintal dos Açores (3)	S. Miguel (Candelária)	11,099 \pm 0,017
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	14,791 \pm 0,038
Mel Flor de Incenso	Pico	9,849 \pm 0,014
Mel dos Açores (1)	Terceira	14,809 \pm 0,025
Apiário Paulo Sousa	Terceira	9,700 \pm 0,043
Mel dos Açores (2)	Terceira	11,956 \pm 0,019
Mel dos Açores (3)	Terceira	12,348 \pm 0,053
Mel dos Açores (4)	Terceira	11,565 \pm 0,023
Mel dos Açores (5)	Terceira	7,518 \pm 0,025
Mel dos Açores (6)	Terceira	20,609 \pm 0,025
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	4,777 \pm 0,030
Mel Serras do Algarve	Algarve	12,423 \pm 0,030
Mel Vinhais Trás-os-Montes	Trás-os-Montes	49,120 \pm 0,056
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	40,318 \pm 0,036
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	17,830 \pm 0,019
Mel Natural	Austrália	10,950 \pm 0,012
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	32,449 \pm 0,022
Mel Orgânico (1)	Argentina	21,858 \pm 0,036
Mel Orgânico (2)	Argentina	18,893 \pm 0,044
Mel Orgânico (3)	Argentina	13,560 \pm 0,022

Os méis Açorianos apresentaram valores médios de actividade antioxidante, entre $7,518 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq AA/mg}$ (Mel dos Açores (5) da Ilha Terceira) e $25,848 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq AA/mg}$ (Apiário Beatriz Afonso da Ilha de São Miguel).

Os méis que apresentaram maior actividade antioxidante foram os méis provenientes de Trás-os-Montes e Serra do Caramulo, ambos com pólen dominantes da família *Ericaceae* (urze e azálea), e da Nova Zelândia ($49,120 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq AA/mg}$, $40,318 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq AA/mg}$ e $32,449 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq AA/mg}$), respectivamente. Em oposição a menor actividade antioxidante foi apresentada pelo mel do Alentejo ($4,777 \times 10^{-4}$ $\mu\text{eq AA/mg}$), monofloral de soagem. Com valores intermédios de encontram-se os méis de incenso, trevo e castanheiro, representantes das amostras dos Açores.

4.3.2 Poder Antioxidante pela Redução de Ferro (FRAP)

No Quadro 13 estão representados os valores obtidos para capacidade de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} das 27 amostras analisadas. Os valores de FRAP foram expressos em função da concentração de Fe (II) (μM) das amostras de mel a 10% e calculados aos 4 minutos, após início da reacção.

Os valores de FRAP variaram significativamente com o tipo de mel analisado, apresentando valores entre $62,737 \pm 0,005$ μM (Alentejo) e $544,784 \pm 0,071$ μM (Serra Caramulo).

Alguns autores observaram que os méis com menor actividade antioxidante (FRAP) são de origem monofloral (trevo, acácia), enquanto os com maior actividade são de medronheiro (Beretta et al, 2005). Neste estudo, verificou-se que os méis dos Açores, com flora predominante de Trevo e Incenso e o mel do Alentejo de Soagem eram os que apresentavam valores mais baixos (DPPH e FRAP). Contudo, o mel de Manuka, cuja flora predominante era o trevo, apresentava uma elevada actividade antioxidante, talvez devido à presença de outros pólenes.

Vários estudos sugerem que o mel com elevada actividade antioxidante pode conter elevados índices de compostos fenólicos. Desta forma, relacionou-se o conteúdo de fenóis com a actividade antioxidante (avaliada pelos dois parâmetros: DPPH e FRAP) dos méis analisados. Observou-se uma elevada correlação ($R^2 = 0,5109$ e $R^2 = 0,6356$, para o DPPH e FRAP, respectivamente) representada na Figura 19, demonstrando-se assim a importância do índice de fenóis na actividade antioxidante.

Ao eliminar os pontos mais distantes (considerados *outliers* pela análise de Kolmogorov-Smirnov, indicados pelos círculos na Figura 19), correspondentes ao mel de Trás-os-Montes e Mel Quintal dos Açores (3) da ilha de São Miguel, obteve-se uma correlação mais elevada, de $R^2 = 0,7309$ para o DPPH e $R^2 = 0,7891$ para o FRAP.

Quadro 13 - Identificação da origem geográfica das amostras de mel e respectivos valores obtidos para o FRAP. Os valores indicados representam a média ± SEM de três determinações. **Outliers* pela análise de Kolmogorov-Smirnov

NOME	REGIÃO	μM Fe(II)
Mel Quinta do Além	S. Miguel (Fajã de cima)	241,737 ± 0,011
Mel Jubileu	S. Miguel (Água de Pau)	224,743 ± 0,033
Mel Quintal dos Açores (1)	S. Miguel (Candelária)	183,144 ± 0,004
Mel Cores	S. Miguel	187,122 ± 0,003
Apiário Beatriz Afonso	S. Miguel (Ribeira Grande)	381,951 ± 0,002
Apiário Paulo Pavao	S. Miguel	182,339 ± 0,019
Mel Quintal dos Açores (2)	S. Miguel (Candelária)	200,873 ± 0,042
Mel Quintal dos Açores (3)*	S. Miguel (Candelária)	121,349 ± 0,050
Mel Flor Silvestre	Pico (Madalena)	160,847 ± 0,003
Mel Flor de Incenso	Pico	89,762 ± 0,007
Mel dos Açores (1)	Terceira	192,334 ± 0,008
Apiário Paulo Sousa	Terceira	132,460 ± 0,009
Mel dos Açores (2)	Terceira	152,256 ± 0,027
Mel dos Açores (3)	Terceira	181,853 ± 0,016
Mel dos Açores (4)	Terceira	131,975 ± 0,012
Mel dos Açores (5)	Terceira	89,374 ± 0,015
Mel dos Açores (6)	Terceira	210,771 ± 0,015
Mel Pulo do Lobo	Alentejo (Mértola)	62,737 ± 0,005
Mel Serras do Algarve	Algarve	172,192 ± 0,007
Mel Vinhais Trás-os-Montes*	Trás-os-Montes	509,704 ± 0,018
Mel Serra do Caramulo	Serra do Caramulo	544,784 ± 0,071
Mel Quinta da Urgueira	Austrália	283,188 ± 0,013
Mel Natural	Austrália	168,074 ± 0,015
Active Manuka Honey	Nova Zelândia	439,107 ± 0,027
Mel Orgânico (1)	Argentina	204,803 ± 0,050
Mel Orgânico (2)	Argentina	208,248 ± 0,050
Mel Orgânico (3)	Argentina	129,840 ± 0,029

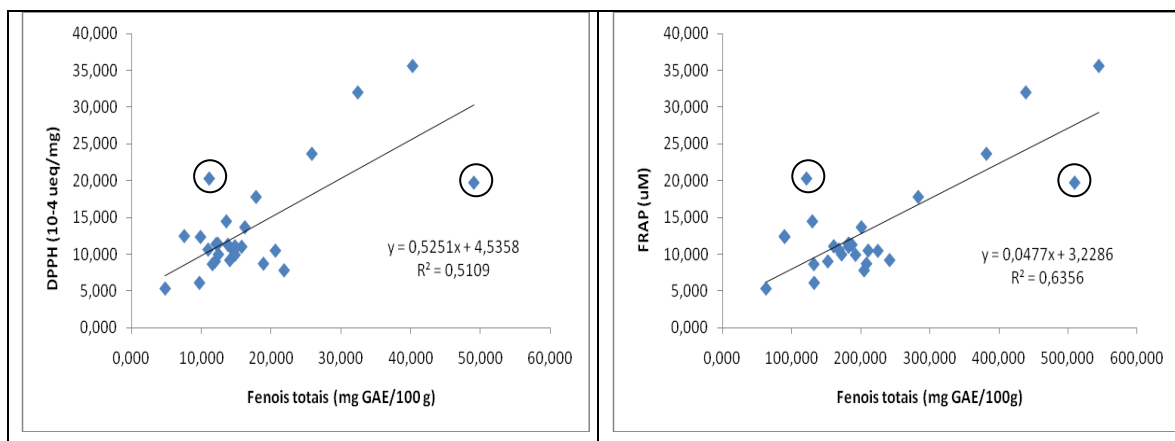


Figura 19 - Correlação entre o teor total de fenóis e a actividade antioxidante das amostras de mel. A: DPPH; B: FRAP

A elevada correlação entre o conteúdo de fenóis e a actividade antioxidante total (FRAP) indica que o poder redutor dos méis deve-se a entidades fenólicas/polifenólicas que podem reduzir o par Fe^{3+}/Fe^{2+} . Da mesma forma, a alta correlação entre fenóis e actividade DPPH demonstra que os fenóis regulam a potência antiradicalar (Beretta *et al.*, 2005).

Seria de esperar que o mel de Trás-os-Montes (TM), Serra do Caramulo (SC) e Nova Zelândia (NZ), que apresentaram elevada actividade antioxidante, possuíssem também um teor mais elevado de fenóis. Esta conclusão apenas se confirmou para os méis da SC e NZ, mas não para o mel de TM. Desta forma, os resultados sugerem que a elevada actividade antioxidante apresentada pelo mel de Trás-os-Montes será apenas parcialmente devida ao conteúdo em fenóis, pelo que existirá outro factor responsável pelo acréscimo da actividade antioxidante.

Embora outros autores tenham igualmente observado fortes correlações entre a capacidade antioxidante de certos méis e o seu conteúdo em fenóis, estes últimos não serão os únicos componentes do mel responsáveis pela actividade antioxidante. Gheldof *et al.* (2002) sugerem que a actividade antioxidante do mel pode resultar da combinação de uma grande variedade de compostos, incluindo fenóis, péptidos, ácidos orgânicos e enzimas.

Tinha-se verificado anteriormente (pág. 49) que a cor está relacionada com o conteúdo em fenol das amostras de mel analisadas. Visto que também o conteúdo de fenol está relacionado com a actividade antioxidante, efectuou-se uma regressão entre a cor e a actividade antioxidante, de forma a avaliar qual a sua contribuição para a mesma. Observou-se uma correlação moderada com o DPPH ($R^2 = 0,4914$) e com o FRAP ($R^2 = 0,5644$), representada na Figura 20.

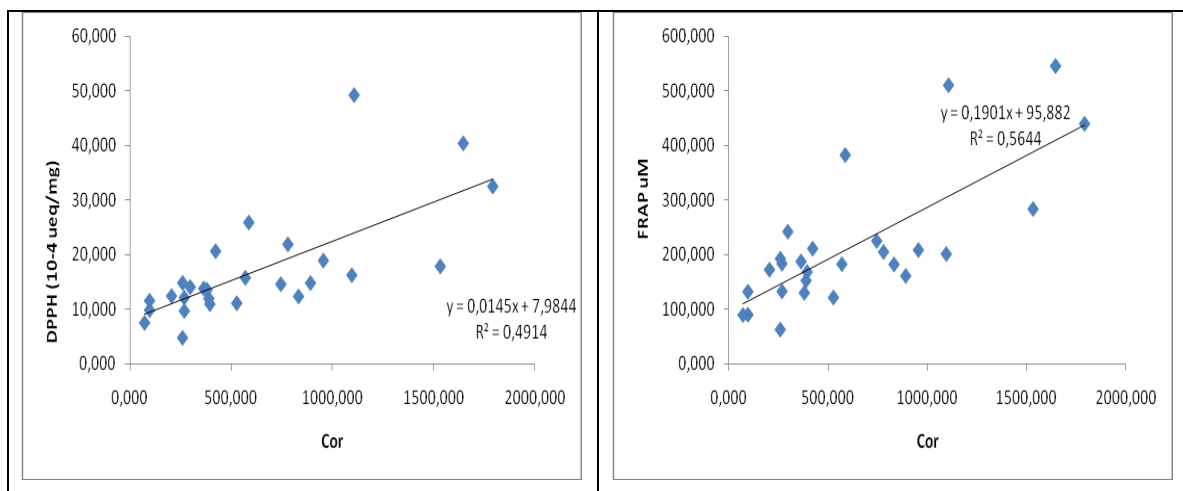


Figura 20 - Correlação entre a cor e a actividade antioxidante das amostras de mel. A: DPPH; B: FRAP

4.4 ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

O *S. aureus* é o agente etiológico mais comum no aparecimento de mastites em bovinos e é resistente à baixa a_w . Esta bactéria desenvolveu resistência à maioria dos antibióticos, mas é susceptível à actividade antimicrobiana do mel, principalmente à actividade não peroxidásica do mel de Manuka. De todos os factores que afectam a actividade antimicrobiana do mel, destacam-se a origem florística, e, principalmente, a produção de peróxido de hidrogénio pelo glucose oxidase (Cooper *et al.*, 1999).

O procedimento utilizado para a determinação da actividade antimicrobiana do mel foi a difusão em agar visto ser de fácil utilização e universalidade. Utilizaram-se poços, visto que os ensaios com discos não eram apropriados para as amostras de mel devido à sua elevada viscosidade.

Os méis foram testados após diluição a 10%, 25% e 50% (p/v), os resultados estão representados na Figura 21. Para testar o efeito da concentração de açúcar (osmolaridade), os méis foram diluídos a 10%. Foram também efectuados estudos sobre a neutralização do pH e adicção de catalase, a 25% e 50% (os dados de inibição estão apresentados no anexo III).

4.4.1 Efeito da Diluição

Os resultados demonstraram variações na actividade antimicrobiana dos 14 méis estudados. No entanto, o efeito da inibição diminuiu consideravelmente, em alguns méis, com a diluição do mel de 50% para 25%, enquanto noutros essa diminuição não é tão acentuada (Figura 21). A pouca alteração da actividade com a diluição é característica dos méis que possuem compostos com actividade antimicrobiana, como foi observado por Baltrušaityte *et al.*, 2007.

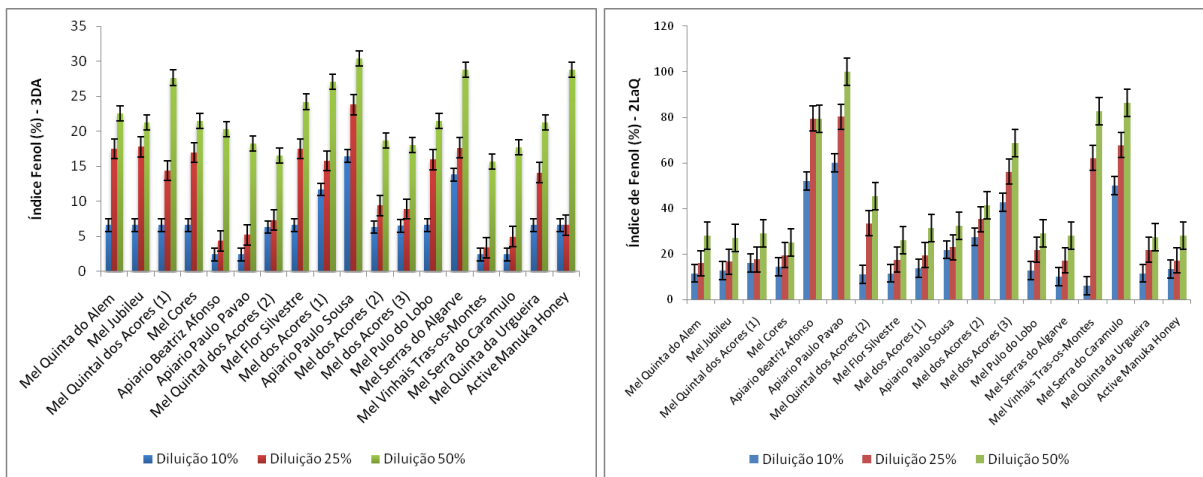


Figura 21 - Inibição do crescimento das duas estirpes de *S. aureus*, 3DA e 2LaQ.

Os valores da actividade antimicrobiana, para a estirpe 3DA, variaram entre 2,4% eq. fenol, para a diluição a 10%, correspondendo aos méis Apiário de Beatriz Afonso, Apiário de Paulo Pavão, da Ilha de São Miguel, Trás-os-Montes e Serra do Caramulo, a 30,4% eq. fenol, para a diluição a 50%, correspondendo ao mel Apiário de Paulo Jorge Cota Sousa, da Ilha Terceira.

Verificou-se que o mel proveniente do Apiário Paulo Sousa da Ilha Terceira foi o que demonstrou maior actividade antimicrobiana, em todas as diluições. O mel de Manuka apresentou elevada actividade antimicrobiana, para o *S. aureus* 3DA, na diluição a 50%.

Os méis dos Açores, excepto o mel do Apiário Beatriz Afonso e Apiário Paulo Pavão, do Alentejo, do Algarve e da Austrália foram os que demonstraram valores de actividade antimicrobiana mais elevada, mesmo após diluição.

De um modo geral, as amostras analisadas contra o *S. aureus* 2LaQ apresentaram valores mais elevados de actividade antimicrobiana. Os valores da actividade antimicrobiana, para a estirpe 2LaQ, variaram entre 5,96 % eq. fenol, para a diluição a 10%, correspondendo à amostra de mel de Trás-os-Montes e 99,95 % eq. fenol, para a diluição a 50%, correspondendo ao mel Apiário de Paulo Pavão da Ilha de São Miguel.

Verificou-se que o mel proveniente do Apiário Paulo Pavão e Apiário de Beatriz Afonso da Ilha de São Miguel, mel de Trás-os-Montes, Serra do Caramulo e Mel dos Açores (3), da Ilha Terceira foram os que demonstraram maior actividade antimicrobiana, em todas as diluições.

Ao comparar o comportamento das duas estirpes, verificámos que a estirpe 2LaQ é mais susceptível aos diferentes méis utilizados. Deste modo, a actividade antimicrobiana mínima observada para a estirpe 2LaQ na diluição de 10% foi de 5,96 % eq. fenol, corresponde aproximadamente à actividade antimicrobiana mínima observada para a mesma amostra na diluição de 25% para a estirpe 3DA (6,057 % eq. fenol). No entanto, o valor máximo observado para a estirpe 2LaQ foi de 99,95 % eq. fenol e para a estirpe 3DA foi de 30,42 % eq. fenol.

4.4.2 Efeito da Catalase - Actividade Antimicrobiana Não-Peroxiásica

A actividade antimicrobiana não-peroxiásica pode ser detectada pela adição de catalase às soluções de mel. A catalase destrói o H_2O_2 que é formado lentamente no mel como resultado da acção do glucose oxidase.

Na Figura 22 e 23 estão representadas as actividades antimicrobianas obtidas, para as duas estirpes de *S. aureus* estudadas, 3DA e 2LaQ, respectivamente, para o efeito da diluição a 25% e 50%, neutralização do pH e adição de catalase.

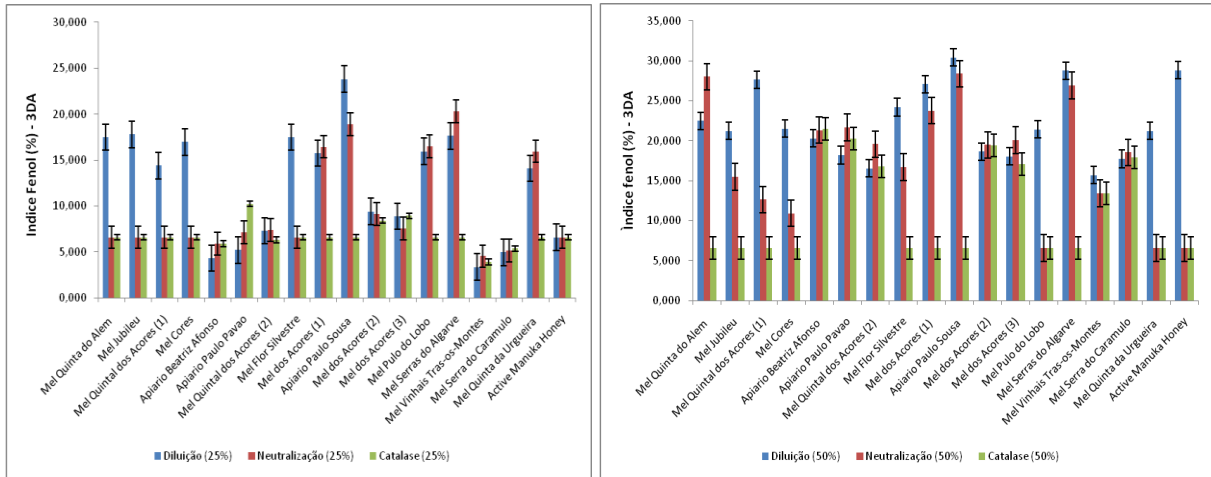


Figura 22 - Efeito da diluição, neutralização do pH e adição de catalase às soluções diluídas de mel a 25% e 50%, sobre a actividade antimicrobiana nos méis estudados contra o *S. aureus* 3DA.

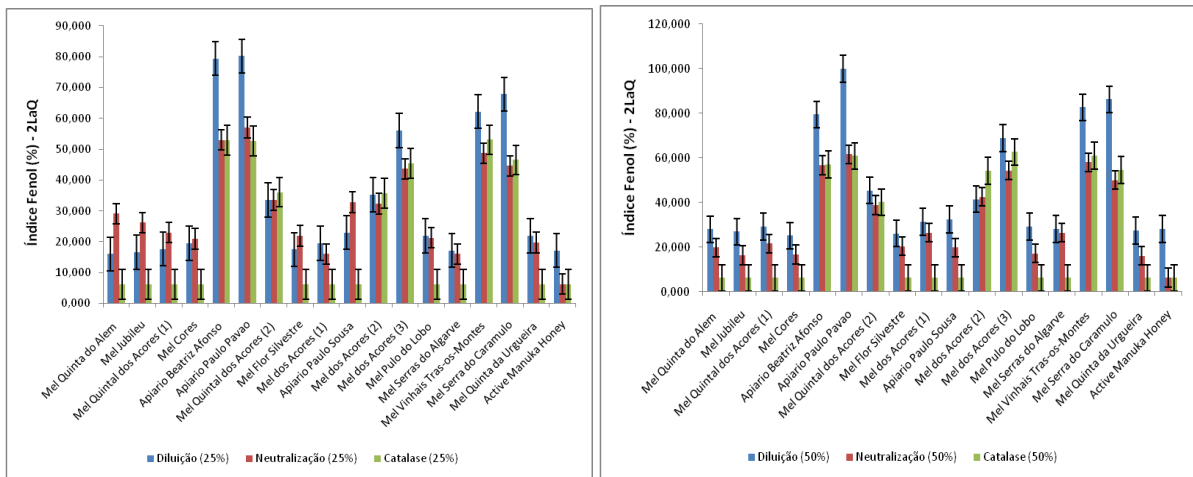


Figura 23 - Efeito da diluição, neutralização do pH e adição de catalase às soluções diluídas de mel a 25% e 50%, sobre a actividade antimicrobiana nos méis estudados contra o *S. aureus* 2LaQ.

Os valores da actividade antimicrobiana, para a estirpe 3DA, variaram, na presença de catalase, entre 3,9 % eq. Fenol, para a diluição a 25%, correspondendo ao mel de Trás-os-Montes, a 23,8 % eq. Fenol, para a diluição a 50%, correspondente ao Apiário Paulo Sousa, da Ilha Terceira.

Verificou-se um decréscimo considerável da actividade antimicrobiana na presença do catalase, indicando que esta se deve, em grande parte, à formação de peróxido de hidrogénio pelo glucose oxidase. As amostras que apresentaram este decréscimo, para a diluição a 25% e 50%, foram: Mel Quinta do Além, Mel Jubileu, Mel Quintal dos Açores (1), Mel Cores, Mel Flor Silvestre, Mel dos Açores (1), Apiário de Paulo Sousa, Mel do Pulo do Lobo, Mel Serras do Algarve e Mel Quinta da Urgueira. Observou-se também uma diminuição acentuada da actividade no mel da Nova Zelândia, apenas para a diluição a 50%. No entanto, em alguns méis esta diminuição não foi tão acentuada, como é o caso do

Mel Quintal dos Açores (2), e Mel dos Açores (2), para a diluição a 25% e Mel dos Açores (3), para a diluição a 50%. Nos méis do Apiário Beatriz Afonso, Apiário Paulo Pavão, Mel de Trás-os-Montes e Mel da Serra do Caramulo, a actividade antimicrobiana aumentou com a adição de catalase, para a diluição a 25%. No entanto, para a diluição a 50%, este aumento da actividade verificou-se no Mel Quintal dos Açores (2) e Mel dos Açores (2), o que indica que a actividade antimicrobiana apresentada por estes méis não se deve, apenas, ao peróxido de hidrogénio.

A actividade antimicrobiana, na presença de catalase, para a estirpe 2LaQ, variou entre 6,25 % eq. fenol, na diluição de 25%, e 62,67 % eq. fenol, para a diluição de 50%, correspondendo ao Mel dos Açores (3) da Ilha Terceira.

Verificou-se actividade não peroxidásica contra o *S. aureus* 2LaQ nos méis: Mel dos Açores (2), da Ilha Terceira e o Mel Quintal dos Açores (2), da Ilha de São Miguel, para a diluição a 25% e o Mel dos Açores (2), para a diluição a 50%. Todas as restantes amostras apresentaram um decréscimo da actividade antimicrobiana, a 25% e 50%, o que indica que o peróxido de hidrogénio era responsável, em parte, pela actividade antimicrobiana destes méis. A actividade antimicrobiana dependente do peróxido de hidrogénio já tinha sido observada por Weston, 2000. Também Cooper *et al.* (1999) observou que uma solução de mel de Manuka a 25% tinha aproximadamente a mesma actividade antimicrobiana com ou sem catalase, pelo que a sua capacidade de inibir o crescimento microbiano era atribuída principalmente a componentes não-peroxidásicos. Esta mesma observação foi verificada quando se utilizou o mel de Manuka contra o *S. aureus* 3DA.

A actividade não-peroxidásica do mel é geralmente atribuída à presença de componentes orgânicos provenientes de fontes florais. No entanto, a variação na actividade antimicrobiana destes méis pode ser atribuída ao seu conteúdo em fenóis (Aljadi and Yusoff, 2003, Irish, *et al.*, 2008). No presente estudo algumas amostras da Terceira, São Miguel, Trás-os-Montes e Serra do Caramulo que apresentaram actividade não-peroxidásica elevada, possuíam também alguns dos valores mais elevados de fenóis totais (Quadro 10).

4.4.3 Efeito da Neutralização do pH

O pH dos méis analisados variou de 3,06 a 4,20 para todas as amostras, e entre 3,06 e 3,6 para as amostras dos Açores. Uma vez que o pH dos méis Açorianos é mais baixo, este vai contribuir para a actividade antimicrobiana das amostras, pelo que foi necessário efectuar a análise da actividade antimicrobiana com o pH neutralizado.

Os valores da actividade antimicrobiana, para a estirpe 3DA, variaram entre 4,5 % eq. fenol, para a diluição a 25%, correspondendo ao mel de Trás-os-Montes, a 28,4 % eq. fenol, para a diluição a 50%, correspondente ao Apiário Paulo Sousa, da Ilha Terceira.

Verificou-se, para a diluição a 25%, que nos méis que apresentaram maior actividade antimicrobiana independente do pH foi o Mel dos Açores (1), Alentejo, Algarve e Austrália. Também o mel proveniente do Apiário Paulo Sousa, embora tenha diminuído a sua actividade com a neutralização, ainda apresentava um valor bastante elevado de actividade antimicrobiana.

Para a diluição a 50%, a maioria dos méis Açorianos e o mel do Algarve apresentaram os valores mais elevados de actividade antimicrobiana, e alguns apresentaram actividade independente do pH.

Os valores da actividade antimicrobiana, para a estirpe 2LaQ, variaram entre 6,3 % eq. fenol, para a diluição a 25%, correspondendo ao mel de da Nova Zelândia, a 61,6 % eq. fenol, para a diluição a 50%, correspondente ao Apiário Paulo Pavão, da Ilha de São Miguel.

Os méis que evidenciaram efeito da neutralização sobre o pH para a diluição de 25% foram Apiário de Beatriz Afonso, Apiário de Paulo Pavão, Mel dos Açores (1), Mel dos Açores (2), Mel dos Açores (3), Mel Serras do Algarve, Mel Vinhais Trás-os-Montes, Mel Serra do Caramulo, Mel Quinta da Urgueira e Mel de Manuka. No Mel Quintal Açores (2) e Mel do Pulo do Lobo verificou-se apenas um ligeiro efeito negativo da neutralização. Nos restantes méis, a neutralização conduziu a um aumento do índice de fenol. Pelo que a actividade antimicrobiana apresentado era independente do pH. Num estudo efectuado por Baltrušaityte *et al.* (2007), também eles observaram que alguns méis, após neutralização do pH, tornaram-se activos contra o *S. aureus*.

À diluição de 50% todos os méis foram afectados negativamente pela neutralização, indicando que o pH influenciou, neste caso, a actividade antimicrobiana das amostras, à excepção do mel dos Açores (3) da Ilha Terceira, que apresentou um ligeiro aumento do índice de fenol.

4.5 ANALISE MULTIVARIADA

Analisando os resultados, verifica-se que existe uma correlação entre o teor em compostos fenólicos, a intensidade da cor e a capacidade de inibição de radicais livres. De facto, os méis mais escuros foram os que apresentaram maior teor em compostos fenólicos e maior capacidade de resgate de radicais. Ao considerar por exemplo, o mel de urze verificou-se que este tipo de mel apresentou o teor mais elevado em antioxidantes e polifenóis, o maior poder de resgate de radicais, sendo também o mais escuro.

A análise de *clusters*, para todas as variáveis físico-químicas estudadas, sobre as distâncias euclidianas quadradas entre amostras de mel com o método de agregação da menor distância produziu o dendograma representado na Figura 24.

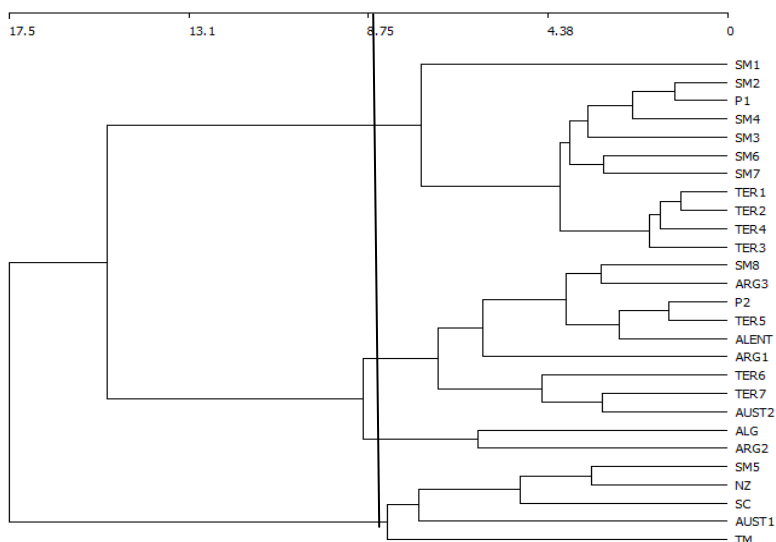


Figura 24 - Dendrograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissemelhança, para as variáveis físico-químicas estudadas.

Assumiu-se o ponto óptimo de corte aos 7,47, através da distância euclidiana de dissimilaridade, pelo que permitiu identificar 4 grupos de méis. O primeiro é constituído pelos méis de São Miguel (excepto SM5 e SM8), o mel P1, e os méis da Terceira (Ter1, 2, 3 e 4). O segundo grupo é constituído pelas amostras de SM8, P2, ARG 1 e 3, Ter 5, 6 e 7, Alentejo e Aust2. O terceiro grupo é constituído pelo mel do ALG e ARG 2. Por fim o quarto grupo é constituído pelas amostras da NZ, TM, SC SM5 e AUST1.

Está descrito que se numa análise de componentes principais os dois ou três primeiros componentes acumularem uma percentagem relativamente alta da variação total, em geral mais de 70%, eles explicariam a variabilidade entre as amostras analisadas (Marchini *et al.*, 2005). Neste caso, a análise de PCA (Figura 25) permitiu resumir a informação relacional entre as variáveis em duas componentes ortogonais que explica 47,32% da variação total das variáveis originais. No entanto são necessárias 5 componentes principais para explicar a variação total (Quadro 14).

Quadro 14 - Estimativa das variâncias e percentagem acumulada da variação total (%) obtidas através da PCA, das 27 amostras analisadas e 15 parâmetros físico-químicos.

Componentes Principais	% Variação Total	% Variação Total Acumulada
1	28.8206	28.8206
2	18.4989	47.3195
3	10.8787	58.1982
4	9.28351	67.4817
5	7.76625	75.248

Verificou-se que as amostras de TM e SC encontravam-se num grupo à parte das restantes amostras, devido à sua cor, composição em fenóis e actividade antioxidante (FRAP e DPPH). Também a amostra da NZ se encontrava se encontrava num grupo separado pelo ácido glucónico e láctico.

PCA Plot - Covariance - Variáveis Normalizadas

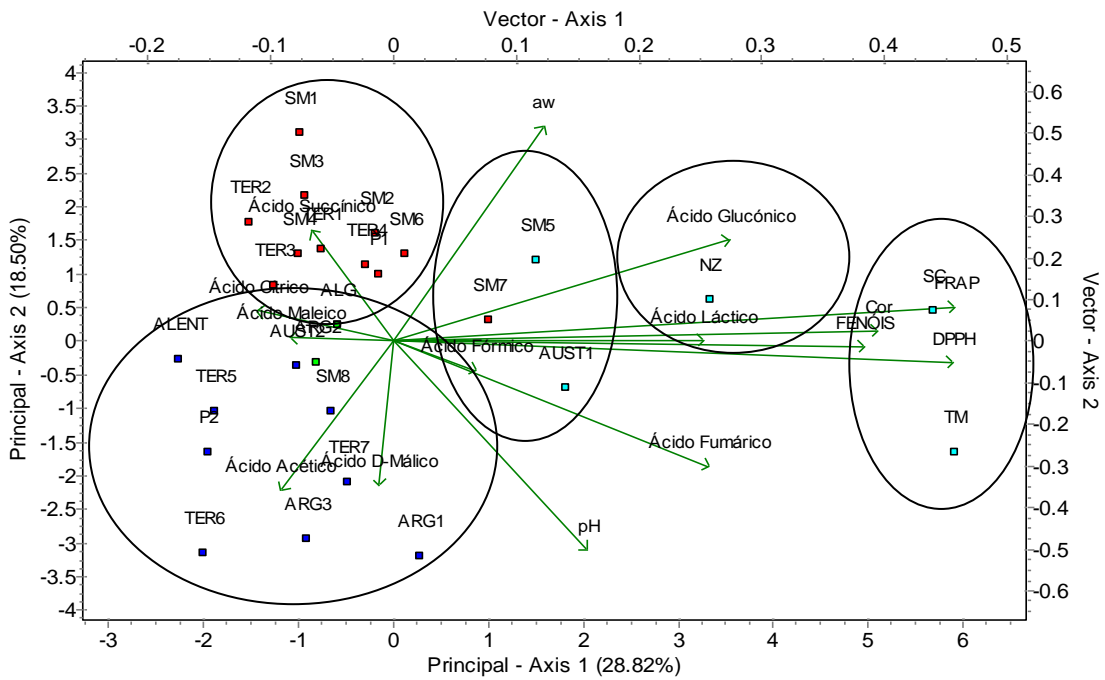


Figura 25 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa a variáveis originais (pH, cor, a_w , fenóis, FRAP, DPPH e ácidos fórmico, D-málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico e fumárico). A primeira componente (C1) explica 28,82% da variância total e a segunda componente (C2) explica 18,5% da variância total.

Efectuaram-se as mesmas análises para o pólen, o qual foi transformado em frequência e posterior conversão em raiz quadrada do arcsen. A análise de *clusters* sobre as distâncias euclidianas quadradas entre amostras de mel com o método de agregação da menor distância produziu o dendograma representada na Figura 26.

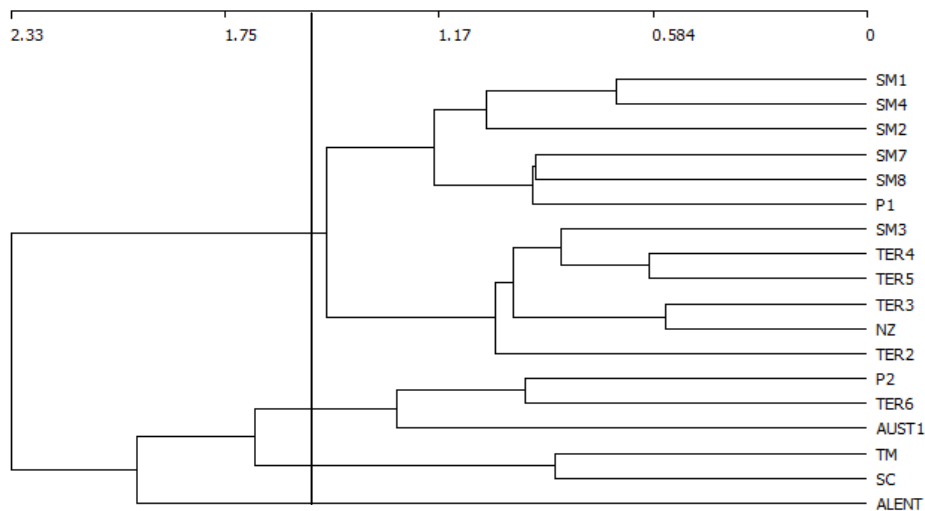


Figura 26 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para a análise polínica.

Pela análise estatística dos grupos polínicos, assumiu-se o ponto de corte óptimo a uma distância de 1,18, através da distância euclidiana de dissimilaridade, tendo-se dividido as amostras em 5 grupos: grupo I amostras provenientes das ilhas de São Miguel (1, 2, 4, 7 e 8) e Pico (1), grupo II amostras de São Miguel (3), da Terceira (2, 3, 4 e 5) e NZ, grupo III Pico (2) e Terceira (6) e Austrália (1), grupo IV as amostras de TM e SC e grupo V a amostra do ALENT.

Para identificar as associações das concentrações percentuais dos ácidos orgânicos e da análise polínica com as regiões estudadas efectuou-se uma análise de (PCA) (Figura 27), a qual permite resumir a informação relacional entre as variáveis em duas componentes ortogonais que explica, apenas, 38,29 % da variação total das variáveis originais, sendo necessários os 6 componentes principais para explicar 72,7% da variação total acumulada (Quadro 15).

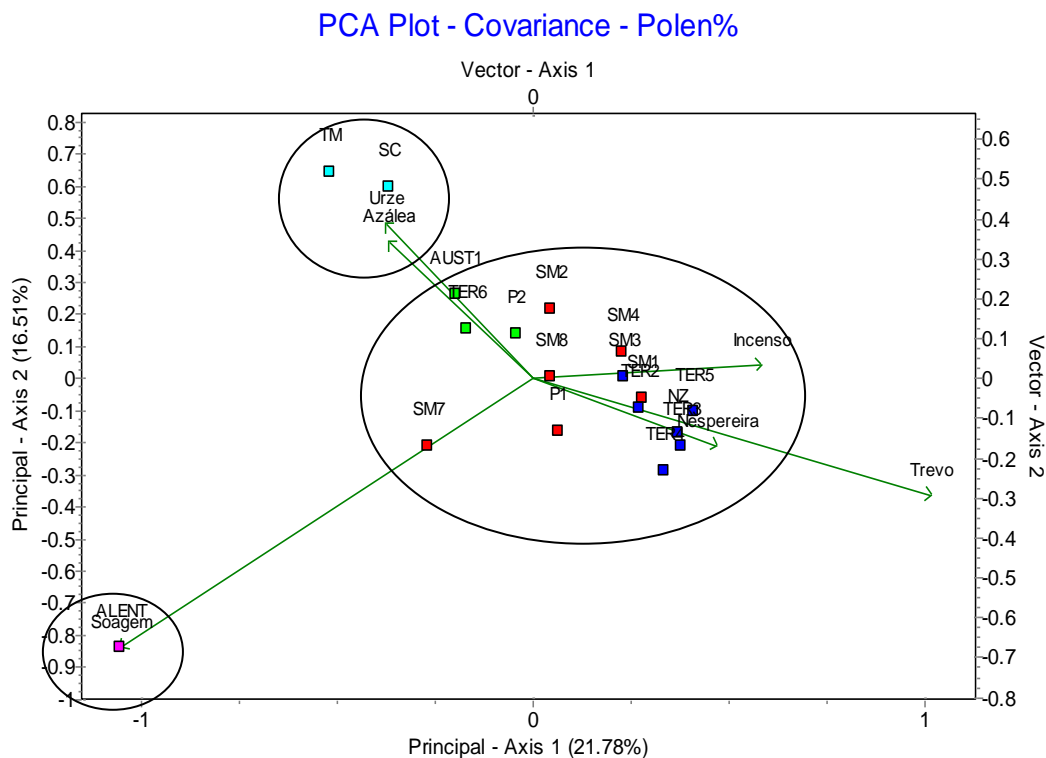


Figura 27 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa às variáveis originais (análise polínica). A primeira componente (C1) explica 21,78% da variância total e a segunda componente (C2) explica 16,51% da variância total.

Verificou-se que a amostra do Alentejo ficava isolada num grupo devido ao tipo polínico Soagem da família Boraginaceae e género *Echium*, enquanto as amostras de TM e SC separam-se pelos tipos polínicos Urze e Azálea, ambos da família Ericaceae. Enquanto, os tipos polínicos Incenso do género *Pittosporum*, o Trevo do género *Trifolium* e a Nespereira do género *Eriobotrya* contribuem para a semelhança das amostras provenientes da Ilha Terceira, da Nova Zelândia e três amostras de São Miguel.

Nesta análise ficou bem evidente a semelhança polínica existente entre as amostras provenientes dos Açores, principalmente da Ilha Terceira, com a amostra da Nova Zelândia. Este caso não é surpreendente, uma vez a flora natural de ambas as regiões é muito semelhante.

Quadro 15 - Estimativa das variâncias e percentagem acumulada da variação total (%) obtidas através da PCA, das 18 amostras analisadas e 83 tipos polínicos.

Componentes Principais	% Variação Total	% Variação Total Acumulada
1	21.7757	21.7757
2	16.5094	38.2851
3	11.7362	50.0213
4	9.80464	59.8259
5	6.75568	66.5816
6	6.14335	72.725

Uma vez que a análise de PCA com todos os parâmetros físico-químicos, actividade antioxidante e conteúdo em ácidos orgânicos apenas explicava 47,32% da variação total entre as amostras de mel, pretendeu-se agora efectuar uma análise multivariada para determinar a influência da composição em ácidos orgânicos e outra para as análises físico-químicas e actividade antioxidante.

Desta forma, a análise de *clusters*, para os ácidos orgânicos estudados, sobre as distâncias euclidianas quadradas entre amostras de mel com o método de agregação da menor distância produziu o dendograma representado na Figura 28.

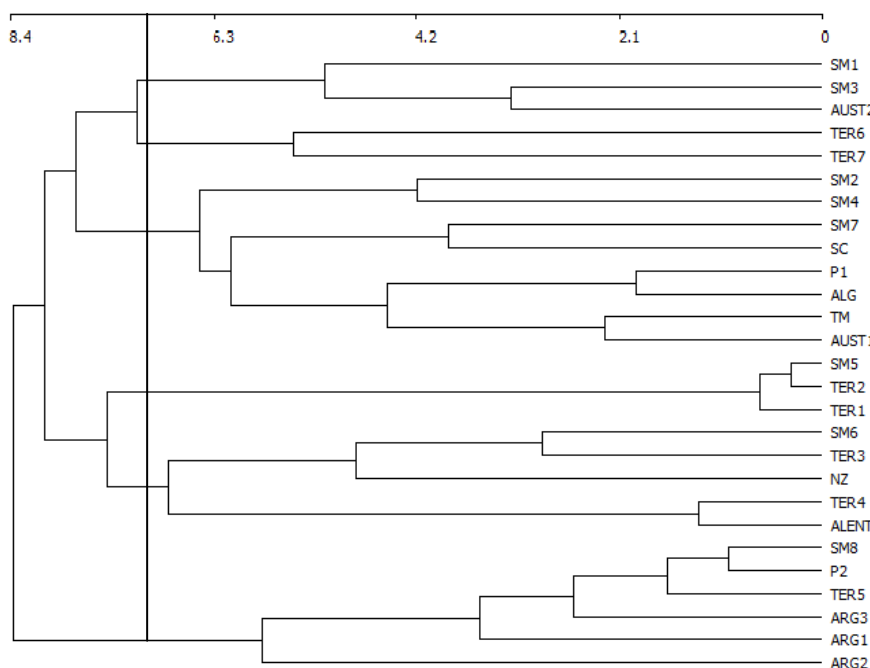


Figura 28 - Dendrograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissemelhança, para os ácidos orgânicos estudados.

A relevância do ácido glucónico para a semelhança entre amostras da Terceira e NZ, pode atribuir-se à actividade antimicrobiana. Observou-se que a amostra do Apiário Paulo Sousa, da Ilha Terceira, foi a que apresentou maior actividade antimicrobiana para a estirpe 3DA e maior actividade independente do pH para a estirpe 2LaQ.

A análise de *cluster*, para as análises físico-químicas e actividade antioxidante produziu o dendograma representado na Figura 30.

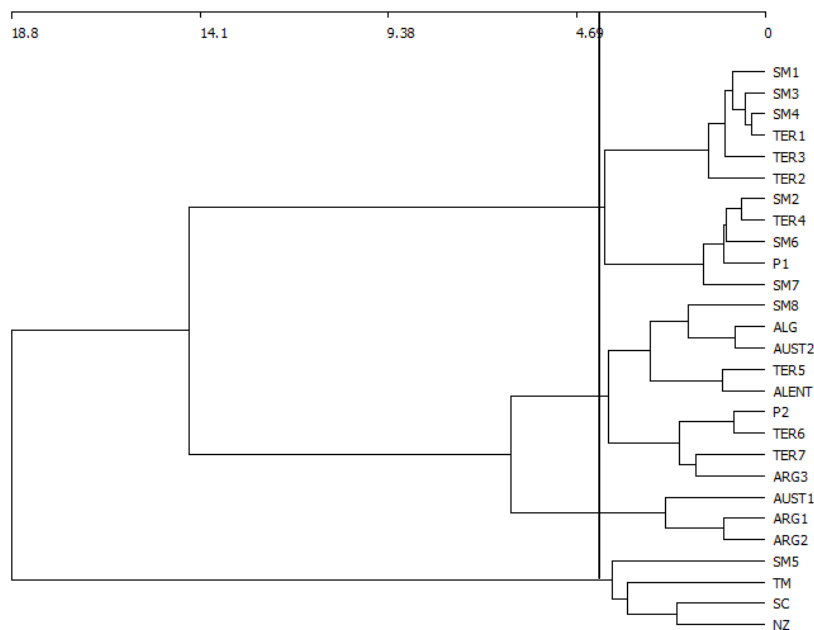


Figura 30 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para as variáveis físico-químicas (pH, cor e a_w) e actividade antioxidante (fenóis, FRAP e DPPH).

O ponto óptimo de corte foi aos 3.99, através da distância euclidiana de dissimilaridade, o qual permitiu dividir em 4 grupos, o primeiro constituído pelas amostras de SM1, 2, 3, 4, 6 e 7, TER1, 2, 3 e 4 e P1, no segundo grupo as amostras de SM8, TER5, 6 e 7, ALG, AUST2, ALENT, P2, e ARG3, no terceiro grupo as amostras AUST1 e ARG1 e 2 e no último grupo as amostras de SM5, TM, SC e NZ.

Efectuou-se também uma análise de PCA (Figura 31), a qual permite resumir a informação relacional entre as variáveis em duas componentes ortogonais que explica 85,98% da variação total das variáveis originais.

Verificou-se também que as amostras de TM, SC e NZ encontram-se num grupo à parte das restantes amostras, devido à sua cor, composição em fenóis e actividade antioxidante (FRAP e DPPH), o que tinha já sido observado na análise com todos os parâmetros físico-químicos (Figura 27). No entanto, sem a influência dos ácidos orgânicos, o componente principal responde a 58,41% da variação total e não 28,82%.

Os resultados obtidos na análise de PCA para a amostra da NZ e as amostras do Norte de Portugal (TM e SC) estão de acordo com os resultados previamente apresentados, uma vez que as amostras foram as que apresentaram a coloração mais escura, maior índice de fenóis, e conseqüentemente maior actividade antioxidante. Para a actividade antimicrobiana, verificou-se que as amostras de TM e SC apresentaram também valores parecidos ao da NZ, conhecido pela sua actividade antimicrobiana.

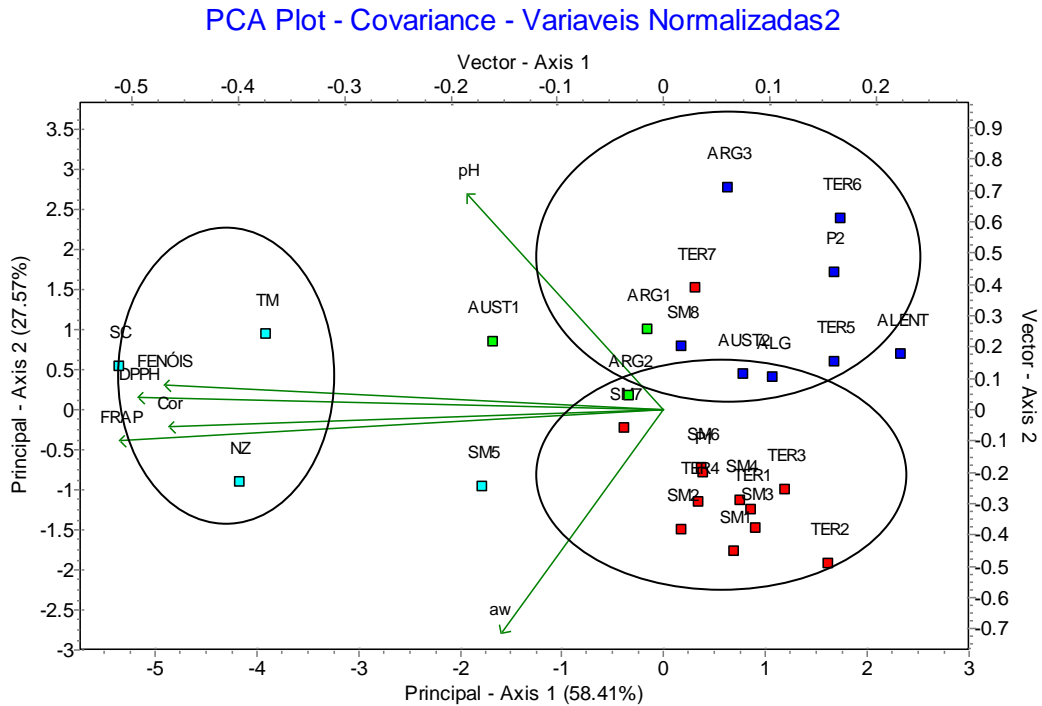


Figura 31 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa às variáveis originais (pH, cor e a_w , fenóis, FRAP e DPPH). A primeira componente (C1) explica 28,82% da variância total e a segunda componente (C2) explica 18,5% da variância total.

Efectuou-se as mesmas análises para a actividade antimicrobiana das duas estirpes de *S. aureus* estudadas. Para a estirpe 2LaQ, a análise de *clusters*, para todas as variáveis físico-químicas estudadas, sobre as distâncias euclidianas quadradas entre amostras de mel com o método de agregação da menor distância produziu o dendograma representado na Figura 32.

O ponto óptimo de corte foi aos 28,27, através da distância euclidiana de dissimilaridade, o qual permitiu dividir em 5 grupos, o primeiro constituído pelas amostras de SM (1, 2, 3 e 4), P1, ALENT, AUST1, TER (1 e 2), ALG e NZ, o segundo grupo as amostras de SM (5 e 6) e SC, no terceiro grupo a amostra da TER4, no quarto grupo a amostra de TM e no quinto grupo as amostras de SM7 e TER (3).

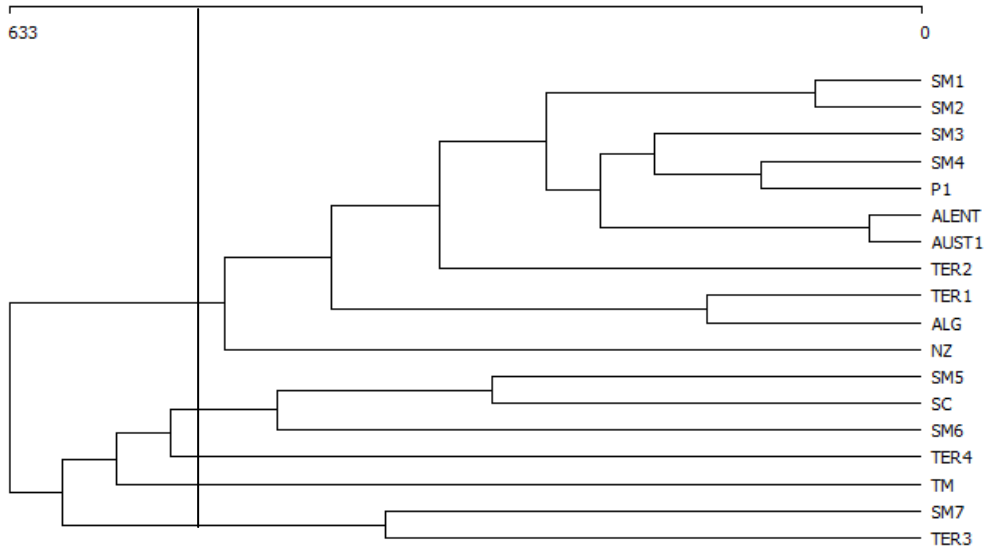


Figura 32 - Dendrograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissimilaridade, para a estirpe de *S. aureus* 2LaQ.

Efectuou-se também uma análise de PCA (Figura 33), a qual permite resumir a informação relacional entre as variáveis em duas componentes ortogonais que explica 96,32% da variação total das variáveis originais.

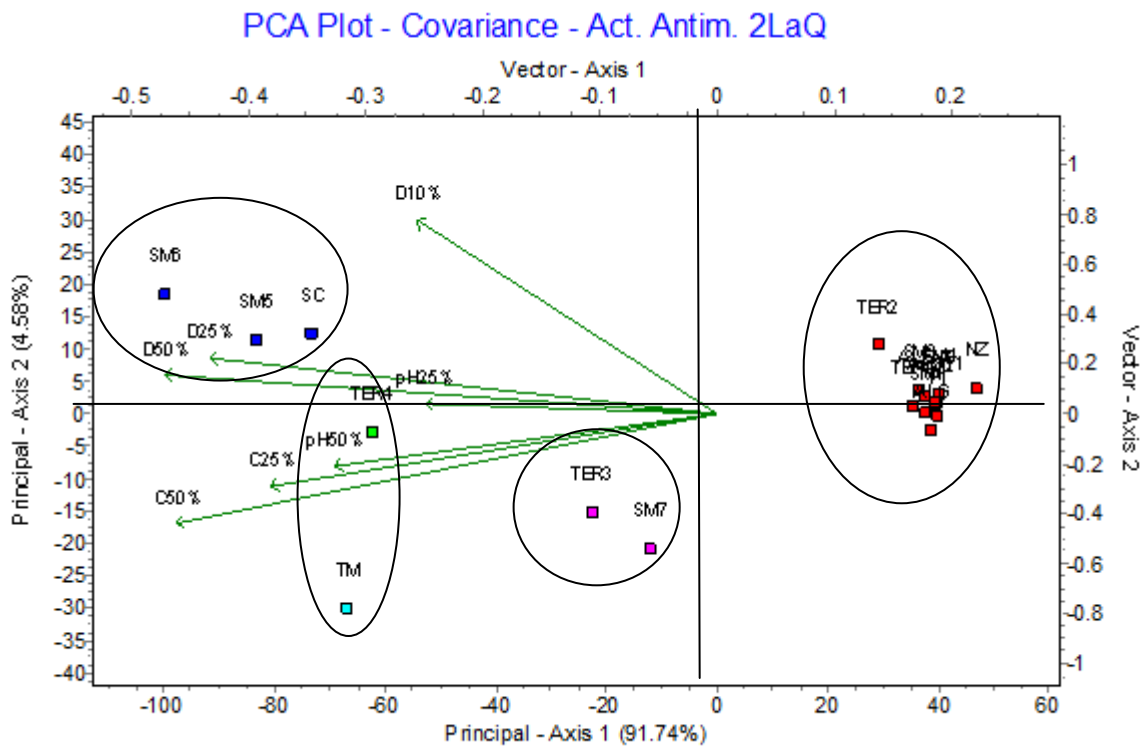


Figura 33 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa às variáveis originais (*S. aureus* 2LaQ). A primeira componente (C1) explica 91,74% da variância total e a segunda componente (C2) explica 4,58% da variância total.

Verificou-se que se podia formar 4 grupos, onde a amostra da SC, SM 5 e SM6 eram separadas pelo efeito da diluição, enquanto a amostra de TM e TER4 pelo efeito da adição de catalase e neutralização do pH.

Para a estirpe 3DA, a análise de *clusters*, para todas as variáveis físico-químicas estudadas, sobre as distâncias euclidianas quadradas entre amostras de mel com o método de agregação da menor distância produziu o dendograma representada na Figura 34.

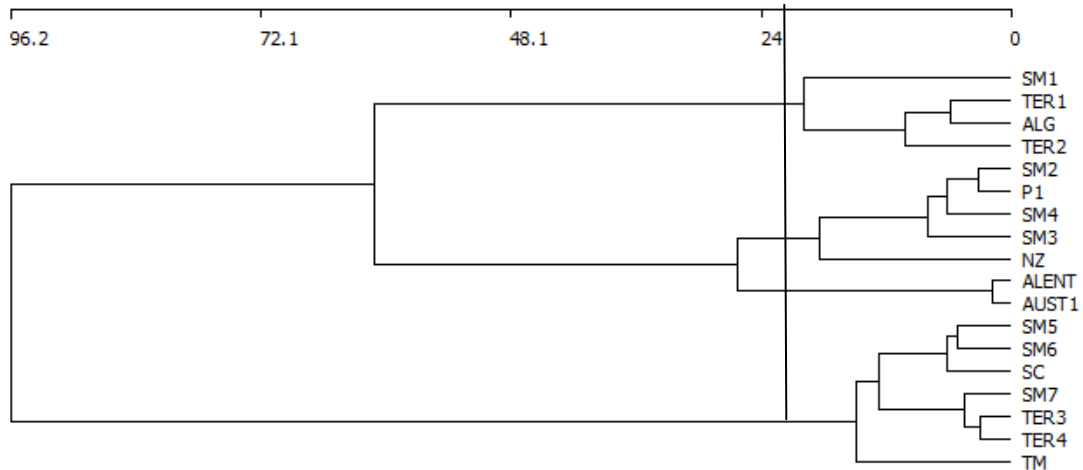


Figura 34 - Dendograma da análise de clusters com o método da menor distância, usando a distância euclidiana quadrada como medida de dissemelhança, para a estirpe de *S. aureus* 3DA.

O ponto óptimo de corte foi aos 20,08, através da distância euclidiana de dissimilaridade, o qual permitiu dividir em 4 grupos: grupo I constituído pelas amostras de SM1, TER1, TER2 e ALG, o grupo II pelos méis SM2, SM3, SM4, P1 e NZ. No Grupo III encontram-se as amostras ALENT e AUST1 e no grupo IV as amostras de SM5, SM6, SM7, TER3, TER4, SC e TM.

Efectuou-se também uma análise de PCA (Figura 35), a qual permite resumir a informação relacional entre as variáveis em duas componentes ortogonais que explica 83,48% da variação total das variáveis originais.

Verificou-se a formação de 3 grupos que se encontram bem separados, ao contrário da estirpe 2LaQ. As amostras de TM, SC SM5, SM6, SM7, TER 3 e TER4 estão separadas pelo efeito da adição de catalase a 50%, as amostras TER 1 e 2, SM1 e Algarve pela neutralização do pH a 50% e efeito da diluição, e as restantes amostras pela adição de catalase a 25%.

PCA Plot - Covariance - Act. Antim. 3DA

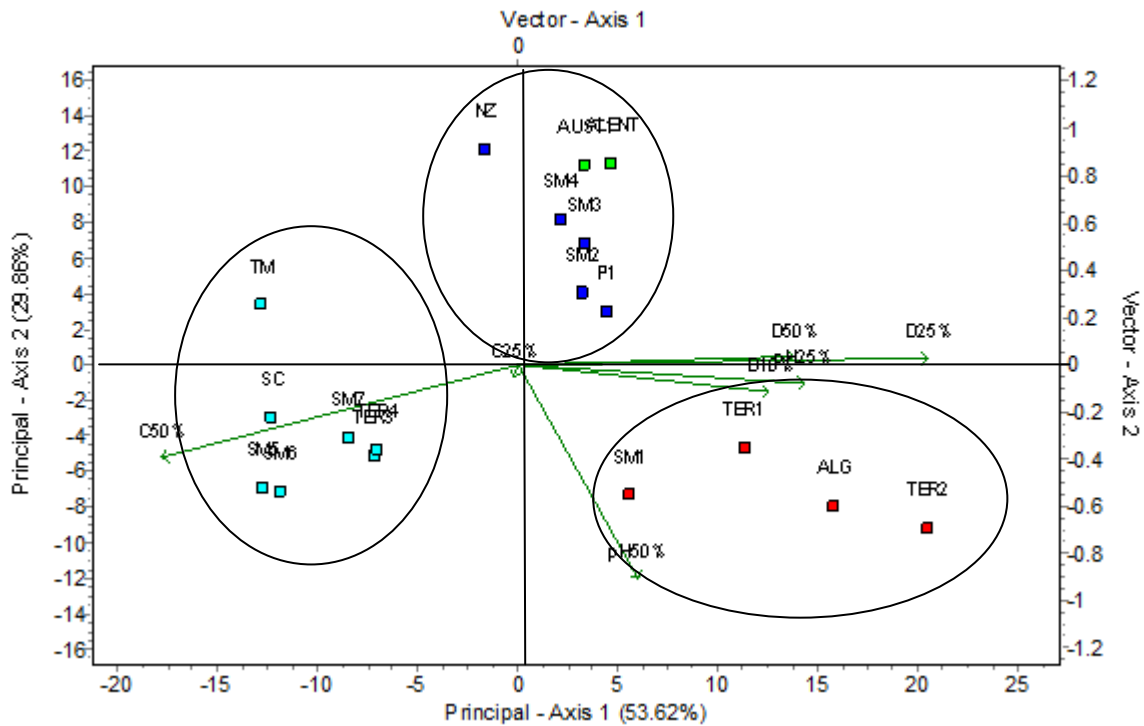


Figura 35 - Posicionamento de cada amostra no mapa bidimensional definido pelas duas componentes principais retidas e a sua posição relativa às variáveis originais (*S. aureus* 3DA). A primeira componente (C1) explica 53,62% da variância total e a segunda componente (C2) explica 29,86% da variância total.

Através destas análises de *clusters* e de componente principal podemos concluir que a composição polínica das amostras de SM (1, 2, 3, 4 e 7), TER (2, 3 e 4) e P1, influenciou o seu agrupamento na análise das variações físico-químicas analisadas, bem como na actividade antimicrobiana. A análise polínica também contribuiu para o agrupamento das amostras do Norte de Portugal (TM e SC).

A análise da composição em ácidos orgânicos pode fundamentar o agrupamento das amostras do Norte de Portugal (TM e SC) e da Austrália, num grupo e as amostras Argentina (1 e 3), Terceira (5), Pico (2) e SM (8) noutra grupo, quando se analisou as variáveis físico-químicas. Também permitiu visualizar a reunião das amostras da Terceira (3 e 4) com a da Nova Zelândia, para a análise polínica.

CAPÍTULO V - CONCLUSÃO

Este estudo pretendeu caracterizar e avaliar as actividades antioxidante e antimicrobiana do mel dos Açores, comparando-o com mel de outras regiões (Continente Português, Austrália, Nova Zelândia e Argentina). No total foram analisadas 27 amostras de mel.

Observou-se que os méis Açorianos (São Miguel, Pico e Terceira), juntamente com os méis da Nova Zelândia e do Alentejo, tendem a ter valores de pH mais baixos (entre 3,1 e 3,6), quando comparados com as outras regiões (Norte de Portugal, Algarve, Austrália e Argentina) (entre 3,7 e 4,4). Observou uma correlação ($R^2 = 0,734$) entre o pH e alguns dos ácidos orgânicos analisados (ácidos acético, málico, fórmico e láctico).

Os méis que apresentaram coloração mais escura foram os da Nova Zelândia, Trás-os-Montes e Serra do Caramulo, sendo os mais claros provenientes da Ilha Terceira, Pico, Algarve e Alentejo. Encontrou-se uma correlação positiva entre a coloração dos méis e o seu conteúdo em fenóis.

Os méis que apresentaram maior actividade antioxidante foram os méis provenientes de Trás-os-Montes e Serra do Caramulo, ambos com pólen dominante da família *Ericaceae* (urze e azálea), a menor actividade antioxidante foi apresentada pelo mel do Alentejo (monofloral de soagem). Com valores intermédios de encontram-se os méis de incenso, trevo e castanheiro, representantes das amostras dos Açores. Observou-se ainda uma elevada correlação entre o conteúdo de fenóis e a actividade antioxidante ($R^2 = 0,7309$ para o DPPH e $R^2 = 0,7891$ para o FRAP).

Podemos concluir que algumas amostras de mel provenientes da ilha Terceira e da Nova Zelândia têm semelhanças nas espécies polínicas e composição em ácidos orgânicos. Observou-se uma maior semelhança polínica entre as amostras das diferentes ilhas dos Açores com a Austrália e Nova Zelândia, bem diferenciadas das amostras de mel do Continente Português. Esta semelhança na origem floral não se confirma na composição em ácidos orgânicos.

Observou-se uma grande variação quanto à composição em ácidos orgânicos (fórmico, D-málico, láctico, acético, maleico, cítrico, succínico, fumárico e glucónico) que poderá estar relacionada não só com a origem geográfica dos diferentes méis mas também, e sobretudo, com a flora que lhe deu origem. Dos ácidos orgânicos estudados, os que melhor contribuíram para a caracterização dos méis foram os ácidos cítrico e glucónico, identificando-se respectivamente duas origens botânicas (*Pittosporum* e *Erica*). Foi ainda

obtido um modelo de regressão linear multivariada que permitiu identificar quais os tipos polínicos que mais contribuem para a concentração destes ácidos no mel.

É de salientar que as amostras de mel provenientes da região Norte de Portugal Continental (Trás-os-Montes e Serra do Caramulo) apresentaram valores significativamente mais elevados ($p < 0,05$) de ácido láctico, fumárico e glucónico. Este último pode estar relacionado com a actividade antimicrobiana do mel, devido à acção do glucose oxidase.

Foram identificados 83 tipos polínicos, nos quais se destacam-se 12 géneros polínicos que aparecem em maior percentagem das amostras analisadas, *Pittosporum* (Incenso - 94 %), *Eucalyptus* (89 %), NI6 (83 %), *Trifolium* (Trevo - 83 %), *Castanea* (78 %), *Rubus* (56 %), Poaceae (56 %), *Eriobotrya* (Nespereira - 50 %), *Helianthus* (50 %), *Ligustrum* (44 %), *Erica* (Urze - 44 %) e *Tibouchina* (Quaresmeira - 39 %).

Foi observada actividade antimicrobiana em algumas amostras de mel, após diluição a 25%, neutralização do pH e adição de catalase em duas estirpes de *S. aureus*. No entanto, a actividade antimicrobiana detectada para uma estirpe, isolada de bovino, não se confirmou na estirpe de referência (2LaQ). De um modo geral, as amostras analisadas contra o *S. aureus* 2LaQ apresentaram valores mais elevados de actividade antimicrobiana. Algumas amostras provenientes das Ilhas de São Miguel e Terceira apresentaram valores elevados de actividade antimicrobiana não peroxidásica (após adição de catalase). Estes dados são promissores, ao indicarem que algumas amostras provenientes dos Açores são mais activas do que o mel de Manuka da Nova Zelândia, que é um mel reconhecido pela sua elevada actividade antimicrobiana. No entanto, a actividade antimicrobiana dos méis analisados apresentou valores díspares consoante a estirpe de *S. aureus* estudada, tornando-se difícil avaliar a eficácia destes méis na inibição do crescimento deste microrganismo.

CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A.E. and ROOZEN, J.P. (1999) Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion, *Food Chemistry*, **64**, 323-329;

ABRAMOVIC,H., JAMNIK,M., BUKAN,L. and KAC,M. (2008) Water activity and water content in Slovenian honeys, *Food Control*, **19**, 1086-1090;

ADAMS,C.J., BOULT,C.H., DEADMAN,B.J., FARR,J.M., GRAINGER,M.N.C-, MANLEY-HARRIS,M. and SNOW,M.J. (2008) Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka honey, *Carbohydrate Research*, **343**, 651–659;

ADELMANN, J. (2005) Própolis: Variabilidade Composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante, Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná;

AIRA, M. J., HORN, H. and SEIJO, M. C. (1998) Palynological analysis of honeys from Portugal, *Journal of Apicultural Research*, **37 (4)**, 247-254;

AL-MAMARY, M., AL-MEERI, A. and AL-HABORI, M. (2002) Antioxidant Activities and Total Phenolics of Honey, *Nutrition Research*, **22**, 1041-1047;

ALJADI, A.M. and KAMARUDDIN, M.Y. (2004) Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, **85**, 513-518;

ALJADI, A.M. and YUSOFF, K.M. (2003) Isolation and Identification of Phenolic Acids in Malaysian Honey with Antibacterial Properties, *Turk. J. Med. Sci.*, **33**, 229-236;

ALLEN, K.L., MOLAN, P.C. and REID,G.M. (1991a) The variability of the antibacterial activity of honey, *Apiacta*, **26**, 114-121;

ALLEN, K.L., MOLAN, P.C. and REID, G.M. (1991b) A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys, *J. Pharm. Pharmacol*, **43**, 817-822;

ALLEN, K.L. and MOLAN, P.C. (1997) The sensitivity of mastitis-causing bacteria to the antibacterial activity of honey, *New Zealand Journal of Agriculture Research*, **40**, 537-540;

ALMEIDA-ANACLETO, D. (2007) Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo, *Tese de Doutorado da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo*;

ANDRADE, P.B., AMARAL, M.T., ISABEL, P., CARVALHO, J.C.M.F., SEABRA, R.M. and CUNHA, A.P. (1999) Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys, *Food Chemistry*, **66**, 503-510;

ANDRADE, P., FERRERES, F. and AMARAL, M.T. (1997a) Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **20**, 2281-2288;

ANDRADE, P., FERRERES, F., GIL, M.I. and TOMÁS-BARBERÁN, F.A. (1997b) Determination of Phenolic Compounds in Honeys by Capillary Zone Electrophoresis, *Food Chemistry*, **60 (1)**, 79-84;

ANKLAM, E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, *Food Chemistry*, **63 (4)**, 549-562;

ARRUDA, O.I. (2003) Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, *Mutation Research*, **9 (20)**, 523-524;

AZEREDO, L.daC., AZEREDO, M.A.A., SOUZA, S.R. and DUTRA, V.M.L. (2003) Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins, *Food Chemistry*, **80**, 249–254;

BALTRUŠAITYTE, V., VENSKUTONIS, P.R. and ČEKŠTERYTE, V. (2007) Antibacterial Activity of Honey and Beebread of Different Origin Against *S. aureus* and *S. epidermidis*, *Food Technol. Biotechnol.*, **45 (2)**, 201–208;

BANKOTA, A.H., TEZUKA, Y., PRASAIN, J.K., MATSUSHIGE, K., SAIKI, I. and KADOTA, S. (1998) Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities, *Journal of Natural Products*, **61**, 896-900;

BARROS, M.A.A (1998) Estudo sobre mamites em novilhas leiteira, *Relatório de estágio*, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra Heroísmo, 79-83;

BARTH, O.M. (1970) Análise microscópica de algumas amostras de mel. 1. Pólen dominante, *An. Acad. Bras. Cienc.*, Rio de Janeiro, **42**, 351-366;

BARTH, O. M. (1989) O pólen no mel brasileiro, Rio de Janeiro: *Gráfica Luxor*;

BASTOS, D.H.M., FRANCO, M.R.B., DA SILVA, M.A.A.P., JANZANTTI, N.S. and MARQUES, M.O.M. (2002) Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de Eucalipto e Laranja, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **22 (2)**, 122-129;

BASUALDO, C., SGROY, V., FINOLA, M. and MARIOLO, J.M. (2007) Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds, *Veterinary Microbiology*, **124**, 375–381;

BATH, P.K. and SINGH, N.A (1999) comparison between Helianthus annuus and Eucalyptus lanceolatus honey, *Food Chemistry*, **67 (4)**, 389-397;

BENZIE, I.F.F. e STRAIN, J.J. (1996) FRAP assay - Measure of Antioxidant Activity, *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76;

BERETTA, G., GRANATTA, P., FERREROB, M., ORIOLIA, M. and FACINO, R.M. (2005) Standardization of Antioxidant Properties of Honey by Spectrophotometric fluorimetric Assays and Chemometrics, *Analytica Chimica Acta*, **533**, 185-191;

BERTONCELJ, J., DOBERŠKA, U., JAMNIK, M. and GOLOB, T. (2007) Evaluation of Phenolic Content, Antioxidant Activity and Colour of Slovenian Honey, *Food Chemistry*, **105**, 822-828;

BOEHRINGER-MANNHEIM GmbH. (1989) *Biochemical Analysis. Food Analysis*; D-Gluconic acid/D-Glucono- α -lactone, Catalog No. 428 191, Mannheim, Germany

BOGDANOV, S. (1997) Nature and Origin of the antibacterial substances in honey, *Lebensm. wiss. U-Technol*, **30**, 748-753;

BOGDANOV, S. (2009) Honey Composition, *Book of Honey*, **Cap. 5**, 1-13;

BOGDANOV, S., CHARRIÈRE, J.D., IMDORF, A., KILCHENMENN, V. and FLURI, P. (2002) Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions, *Apidologie*, **33**, 399–409;

BOGDANOV, S., KILCHENMANN, V., FLURI, P., BÜHLER, U. and LAVANCHY, P. (1999) Influence of organic acids and components of essential oils on honey taste, *Swiss Bee Research Center*, 1-6;

BOGDANOV, S., RUOFF, K. and ODDO, L.P. (2004) Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys, *Apidologie*, **35**, S4-S17;

BOTELHO, E.C.A. (2001) Contributo para a caracterização do "Mel de Incenso" dos Açores, *Relatório de licenciatura*, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. and BERSET, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, **28**, 25-30;

BRUDZYNSKI, K. (2006) Effect of H₂O₂ on Antibacterial Activities of Canadian Honeys, *Can. J. Microbiol.*, **52**, 1228–1237;

BURDOK, G.A. (1998) Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis), *Food and Chemical Toxicology*, **36 (4)**, 347-363;

CAMPOS, M.G.R (1987) Contribuição para o estudo do mel, pólen, geleia real e própolis, *Boletim Faculdade Farmácia de Coimbra*, **11 (2)**, 17-47;

CARVALHO, C.A.L, SOUZA, B.A., SODRÉ, G.S., MARCHINI, L.C. e ALVES, R.M.O. (2005) Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química, *Série Meliponicultura*, **4**;

CHERCHI, A., SPANEDDA, L., TUBEROSO, C. and CABRAS, P. (1994) Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey, *J. Chromatogr.*, **669 (1-2)**, 59-64;

CHIRIFE, J., ZAMORA, M.C. and MOTTO, A. (2006) The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys, *Journal of Food Engineering*, **72**, 287-292;

CLEMENTS, M.O. and FOSTER, S.J. (1999) Stress resistance in *Staphylococcus aureus*, *Trends in Microbiology*, **7 (11)**, 458-462;

COMETTO, P.M., FAYE, P.F., NARANJO, R.D.P., RUBIO, M.A. and ALDAO, M.A.J. (2003) Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5079-5087;

COOPER, R.A., MOLAN, P.C. and HARDING, K.G. (1999) Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds, *J. R. Soc. Med.*, **92**, 283-285;

CRANE, E. (1987) O livro do mel, 2.ed. São Paulo: *Nobel*, 226p;

CRANE, E. (1990) The traditional hive products: honey and beeswax, *Bees and Beekeeping, Science, Practice and World Resources*; Heinemann Newnes: Oxford, U.K., **Chapter 13**, 400-401;

CRANE, E. (2004) A short history of knowledge about honey bees (*Apis*) up to 1800, *Bee World*, **85 (1)**, 6–11;

DEKKER, M. (1998) Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, *Seppo Salminen. Atle von Wright*, 2nd ed. Rev., 618;

DIAS, L.A., PERES, A.M., VILAS-BOAS, M., ROCHA, M.A., ESTEVINHO, L. e MACHADO, A.A.S.C. (2008) An electronic tongue for honey classification, *Microchim Acta*, **163**, 97–102;

ESTEVINHO, L., PEREIRA, A.P., MOREIRA, L., DIAS, L.G. and PEREIRA, E. (2008) Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 3774–3779;

FAO (1996) Value-added products from beekeeping, *FOA Agricultural Services Bulletin*, Rome, Italy: FAO;

FERREIRA, I.C.F.R., AIRES, E., BARREIRA, J.C.M. e ESTEVINHO, L.M. (2009) Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract, *Food Chemistr*, **114 (4)**, 1438-1443

FERRERES, F., ANDRADE, P. and TOMÁS-BARBERÁN, F.A. (1996) Natural Occurrence of Abscisic Acid in Heather Honey and Floral Nectar, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2053-2056;

FERRERES, F., ORTIZ, A., SILVA, C., GARCÍA-VIGUERA, C., TOMÁS-BARBERÁN, F.A. and TOMÁS-LORENTE, F. (1992) Flavonoids of "La Alcarria" honey, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **194**, 139-143;

FINOLA, M.S., LASAGNO, M.C., MARIOLI, J.M. (2007) Microbiological and chemical characterization of honeys from Central Argentina, *Food Chemistry*, **100 (4)**, 1649-1653;

FORTUNA, A.M. (2006) Estudo da Bioactividade do mel, *Tese de Licenciatura em Tecnologia Agro-Alimentar*, Universidade dos Açores;

FRANKEL, E.N. and MEYER, A.S. (2000) The problem of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1925-1941;

FRANKEL, S., ROBINSON, G.E. and BERENBAUM, M.R. (1998) Antioxidant content and correlated characteristics of 14 monofloral honeys, *J. Apic. Res.*, **37**, 27-31;

GHELDOF, N. and ENGESETH, N.J. (2002) Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3050-3055;

GHELDOF, N., WANG, X.H. and ENGESETH, N.J. (2002) Identification and quantification of antioxidant components of Honey from various floral sources, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5870-5877;

HOWER, F. N. (1953) Plantas melíferas, Barcelona: *Reverté*;

INOUE, K., MURAYAMA, S., SESHIMO, F., TAKEBA, K., YOSHIMURA, Y. and NAKAZAWA, H. (2005) Identification of phenolic compound in manuka honey using ESR and liquid chromatography with coulometric array detection, *J. Sci. Food. Agric.*, **858**, 72–87;

IRISH, J., CARTER, D.A. and BLAIR, S.E. (2008) Antibacterial Activity of Honey, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **32**, 89–98;

IWAMA, S. and MELHEM, TS. (1979) The pollen spectrum of the honey of *Tetragonisca angustula angustula* Latreille, *Apidologie*, **10**, 275-95;

JABLONSKI, L.M. and BOHACH, G.A. (1997) *Staphylococcus aureus*, In: DOYLE, M.P., BEUCHOT, C.P. and MONTEVILLE, T.J. (Eds) *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Washington: American Society of Microbiology Press, 353-375;

JEFFREY, A.E. and ECHAZARRETA, C.M. (1996) Medical uses of Honey, *Biomed*, **7**, 43-49;

KAUR, I.P. and GEETHA, T. (2006) Screening Methods for Antioxidants - A Review, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **6**, 305-312;

KÜÇÜK, M., KOLAYL, S., KARAOĞLU, S., ULUSOY, E., BALTAC, C. and CANDAN, F. (2007) Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia, *Food Chemistry*, **100**, 526–534;

LOUVEAUX, J., MAURIZIO, A. and VORWOHL, G. (1978) Methods of melissopalynology, *Bee World*, **59 (4)**, 139-157;

MADEJCZYK, M. and BARALKIEWICZ, D. (2008) Characterisation of Honey from different areas of Poland by their Physico-chemical Parameters and trace elements, *Proceedings of ECOpole*, **2 (1)**, 59-63;

MAIA, M., RUSSO-ALMEIDA, P.A. e PEREIRA, J.O. (2005) Caracterização do Espectro Polínico dos Méis do Alentejo (Portugal), *Silva Lusitana*, **13 (1)**, 95 - 103;

MARCHINI, L.C., MORETI, A.C.:C.C. and OTSUK, I.P. (2005) Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, **25 (1)**, 8-17;

MAROCCO, J. (2007) *Análise Estatística com utilização do SPSS, Edições Sílabo*, 3ª ed.

MATEO, R.; BOSCH-REIG, F. (1997) Sugar profiles of Spanish unifloral honeys, *Food Chem.*, **60**, 33-41;

MATO, I., HUIDOBRO, J.F., SÁNCHEZ, M.P., MUNIATEGUI, S., FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A. and SANCHO, M.T. (1997) Enzymatic Determination of Total D-Gluconic Acid in Honey, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3550-3553;

MATO, I., HUIDOBRO, J.F., SÁNCHEZ, M.P., MUNIATEGUI, S., FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A. and SANCHO, M.T. (1998) Enzymatic determination of L-malic acid in honey, *Food Chemistry*, **62** (4), 503-508;

MATO, I., HUIDOBRO, J.F., SIMAL-LOZANO, J. and SANCHO, M.T. (2006) Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 1541-1550;

MAVRIC, E., WITTMANN, S., BARTH, G. and HENLE, T. (2008) Identification and Quantification of methylglyoxal as dominant antibacterial Constituent of Manuka Honey, *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 483 – 489;

MEDA, A., LAMIEN, C.E., ROMITO, M., MILLOGO, J. and NACOULMA, O.G. (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry*, **91**, 571-577;

MENDONÇA, K., MARCHINI, L.C., SOUZAL, B.A., ALMEIDA-ANACLETO, D. e MORETI, A.C.C.C. (2008) Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por *Apis mellifera* L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo, *Ciência Rural*, Santa Maria, **38** (6), 1748-1753;

MOAR, N.T. (1985) Pollen analysis of New Zealand honey, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **28**, 39-70;

MOLAN, P.C. (1992) The antibacterial activity of honey, 1. The nature of the antibacterial activity, *Bee World*, **73** (1), 5-28;

MOLAN, P.C. (2001) Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected wounds, *World Wide Wounds*, Department of Biological Sciences, University of Waikato;

MOLAN, P.C. (2002) Honey as an antimicrobial agent, *Waikato Honey research unit*, University of Waikato;

MOLYNEUX, J. (2003) The Use of the Stable DPPH for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Technol.*, **26 (2)**, 211-219;

MUNDO, M.A., PADILLA-ZAKOUR, O.I. and WOROBO, R.W. (2004) Growth Inhibition of Foodborne Pathogens and Food Spoilage Organisms by Select Raw Honeys, *International Journal of Food Microbiology*, **97**, 1 – 8;

NAGAI, T., SAKAIA, M., INOUEC, R., INOUEC, H. and SUZUKIA, N. (2001) Antioxidative Activities of Honeys, Royal Jelly and Propolis, *Food Chemistry*, **75**, 237-240;

NELSON, E.K. and MOTTERN, H.H. (1931) Some organic acids in honey, *Ind. Eng. Chem.*, **23 (3)**, 335;

NOZAL, M.J., BERNAL, J.L., MARINERO, P., DIEGO, J.C., FRECHILLA, J.I., HIGES, M. and LLORENTE, J. (1998) HPLC Determination of Organic Acids in Honeys from Different Botanical Origin, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, **21 (20)**, 3197-3214;

NZEAKO, B.C. and HAMDJ, J. (2000) Antimicrobial potential of honey on some New Zealand honeys, *Medical sciences*, **2**, 75-79;

ODDO, L.P., PIAZZA, M.G. and PULCINI, P. Invertase activity in honey, 1-17;

OLAITAN, P.B., ADELEKE, O.E. and OLA, I.O. (2007) Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes, *African Health Sciences*, **7**, 159-165;

ORTIZ- VALBUENA, A. (1988) The ash content of 69 honey samples from La Alcarria and neighbouring areas, collected in the period 1985-87, *Cuadernos de Apicultura*, **5**, 8-9; Resumo 638 (1989) em *Apicultural Abstracts*, **40 (4)**, 360;.

PARK, Y.K., KOO, H.M., ABREU, J.A.S., IKEGAKI, M., CURY, J.A. and ROSALEN, P.L. (1998) Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms, *Current of Microbiology*, **36**, 24-28;

PAVÃO, P.R.E (1997) Contributo para o diagnóstico precoce da Varroose, *Relatório de estágio*, DCA, UA, AH

PEREIRA, A.P.R. (2008) Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel, *Tese de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar*, Escola Superior Agrária de Bragança

PEREIRA, F.M., LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. (2003) Mel, Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/organizacao.htm>

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. and SAURA-CALIXTO, F. (2006) Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays, *Food Research International*, **39**, 791-800;

ROWE, C. (2005) Torres Strait Pollen Flora, Pollen and spore images from **Appendix 3** in: A Holocene History of Vegetation Change in the Western Torres Strait Region, Queensland, Australia, Unpublished **PhD Thesis**, Monash University;

RUIZ-ARGÜESO, T. and RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. (1973) Gluconic acid-producing bacteria from honeybees and ripening honeys, *J. Gen. Microbiol.*, **76 (Part 1)**, 211-216;

SÁNCHEZ-MORENO, C. (2002) Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science and Technology International*, **8**, 121-137;

SATO, T. and MIYATA, G. (2000) The nutraceutical Benefit, part III: Honey, *Nutrition*, **16**, 468-469;

SCHOEDER, A., HORN, H., and PIEPER, H.J. (2005) The correlation between moisture content and water activity (aw) in honey, *Deutsche Lebensmittel- Rundschau*, **101 (4)**, 139–142;

SCHWARZ, K., BERTELSEN, G., NISSEN, L.R., GARDNER, P.T., HEINONEN, M.I., HOPIA, A., HUYNH-BA, T., LAMBELET, P., McPHAIL, D., SKIBSTED, L.H. and TIJBURG, L. (2001) Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds, *Eur. Food Res. Technol.*, **212**, 319-328;

SODRÉ, G.S., MARCHINI, L.C., CARVALHO, C.A.L. and MORETI, A.C. C.C. (2007b) Pollen analysis in honey samples from the two main producing regions in the Brazilian northeast, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **79 (3)**, 381-388;

SODRÉ, G.daS., MARCHINI, L.C., MORETI, A.C.C.C. and CARVALHO, C.A.L. (2008) Tipos polínicos encontrados em amostras de méis de *Apis mellifera* em Picos, Estado do Piauí, *Ciência Rural*, Santa Maria, **38 (3)**, 839-842;

SODRÉ, G.daS., MARCHINI, L.C., MORETI, A.C.C.C., OTSUK, I.P. and CARVALHO, C.A.L. (2007) Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará, *Ciência Rural*, Santa Maria, **37 (4)**, 1139-1144;

STINSON, E.E., SUBERS, M.H., PETTY, J., WHITE, J.W.Jr. (1960) The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**, 6-12;

SUÁREZ-LUQUE, S., MATO, I., HUIDOBRO, J.F. and SIMAL-LOZANO, J. (2002b) Solid-phase extraction procedure to remove organic acids from honey, *J. Chrom. B*, **770**, 77-82;

SUÁREZ-LUQUE, S., MATO, I., HUIDOBRO, J.F., SIMAL-LOZANO, J. and SANCHO, M.T. (2002a) Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **955**, 207-214;

SWALLOW, K.W.; LOW, N.H. (1990) Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1828-1832;

TAORMINA, P.J., NIEMIRA, B.A. and BEUCHAT, L.R. (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power, *International Journal of Food Microbiology*, **69**, 217-225;

TOMÁS-BARBERÁN, F.A., MARTOS, I., FERRERES, F., RADOVIC, B.S. and ANKLAM, E. (2001) HPLC flavonoid profiles as markers for the botanic origin of European unifloral honeys, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 485-496;

TURKMEN, N., SARI, F., POYRAZOGLU, E.S. and VELIOGLU, Y.S. (2006) Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey, *Food Chemistry*, **95**, 653–657;

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M., MAZUR, M. and TELSER, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84;

VARGAS, T. (2006) Avaliação da Qualidade do Mel Produzido na Região dos Campos Gerais do Paraná, Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Ponta Grossa - Brasil

WESTON, R.J. (2000) The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: review, *Food Chemistry*, **71**, 235-239;

WEIGEL, K., OPITZ, T. and HENLE, T. (2004) Studies on occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey, *Eur. Food Res. Technol.*, **218**, 147 –151;

WIESE, H. (1995) Novo manual de apicultura, Guaíba: *Agropecuária*;

WILLARD, D.A., BERNHARDT, C.E. and WEIMER, L. (2004) Atlas of Pollen and Spores of the Florida Everglades, *Palynology*, **28**, 175–227;

WHITE, J.W. (1975) Composition of honey. In: CRANE, E. Honey, A Comprehensive Survey, Heinemann, London, **Cap. 6**, 157-206;

WHITE, J.W.Jr. (1978) Honey, *Advances in Food Research*, **24**, 287–373;

WHITE, J.W.Jr. (1979) Composición y propiedades de la miel. In *La Apicultura en los Estados Unidos*, McGregor, S. E., Ed. Limusa: México, 60-62.

WHITE, J.W.Jr. (1992) Honey. In *The Hive and the Honey Bee*; Graham, J.M., Ed.; Dadant and Sons: Hamilton, IL, **Chapter 21**, 877-878.

WHITE, J.W. and RUDYJ,O.N. (1978) The protein content of honey, *J.Apic. Res.*, **17**, 234-238;

WHITE, J.W.Jr. and SUBERS,M.H. (1963) Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay, *J. Apic. Res.*, **2**, 93-100;

WHITE, J.W.Jr., SUBERS, M.H., SCHEPARTZ, A.I. (1963) The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucoseoxidase system, *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 57-70;

WOOTTON, M., EDWARDS, R.A., FARAJI-HAREMI, R., WILLIAMS, P.J. (1978) Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys. 3. Changes in volatile components, *J Apicultural Res*, **17(3)**, 167-172;

YAO, L., JIANG, Y., SINGANUSONG, R., D'ARCY, B., DATTA, N., CAFFIN, N. and RAYMONT, K. (2004) Flavonoid in Australian Malaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication, *Food Research International*, **37 (2)**, 166–174;

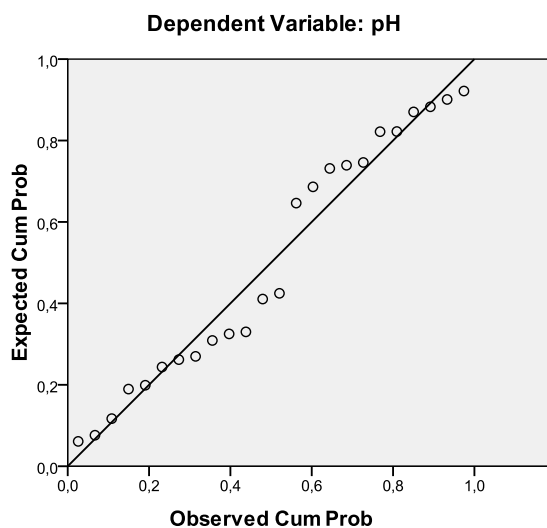
ZAMORA, M.C. and CHIRIFE, J. (2006) Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina, *Food Control*, **17**, 59-64;

ZAMORA, M.C., CHIRIFE, J. and ROLDÁN, D. (2006) On the nature of the relationship between water activity and % moisture in honey, *Food Control*, **17**, 642-647;

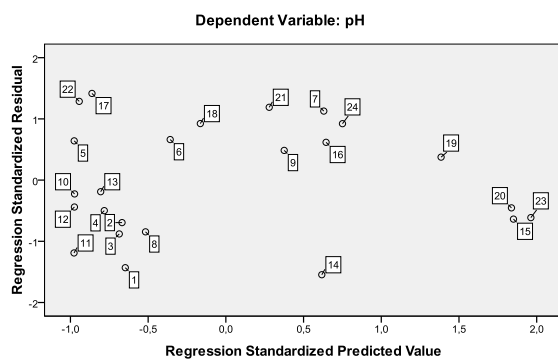
ANEXO I - REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA

1) Ácidos Orgânicos + pH

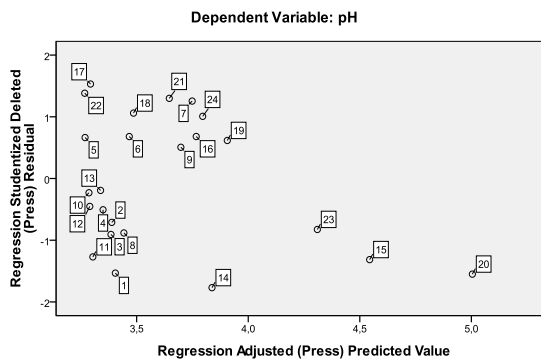
Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



Scatterplot



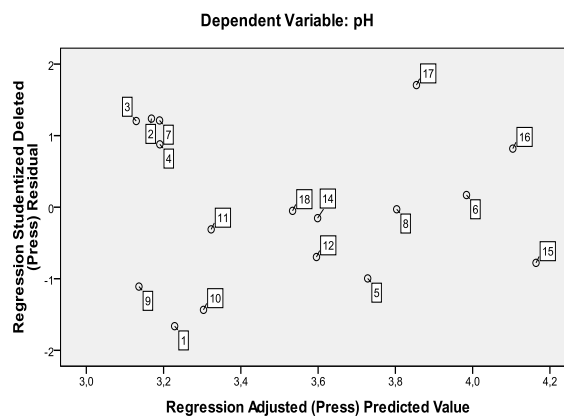
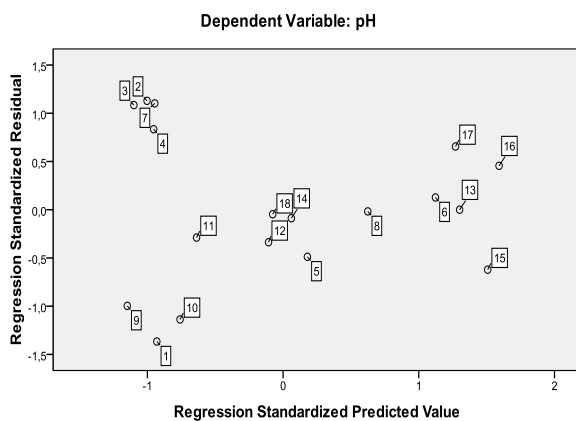
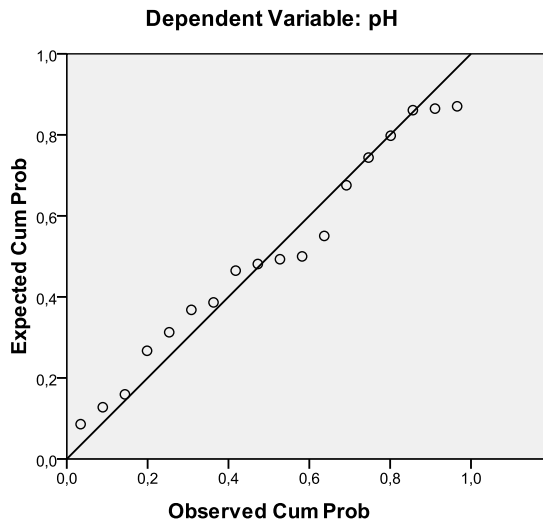
Scatterplot



Uma vez que pelo teste de distribuição (Kolmogorov-Smirnov) o valor de p (exacto) é 0,494 não rejeitamos a hipótese de que a variável segue uma distribuição normal para os habituais níveis de significância ($\alpha = 0,01$; 0,05 ou 0,1). Desta forma foi-se determinar os *outliers*, que eram as amostras SM6, SC e ARG3, as quais foram eliminadas da regressão.

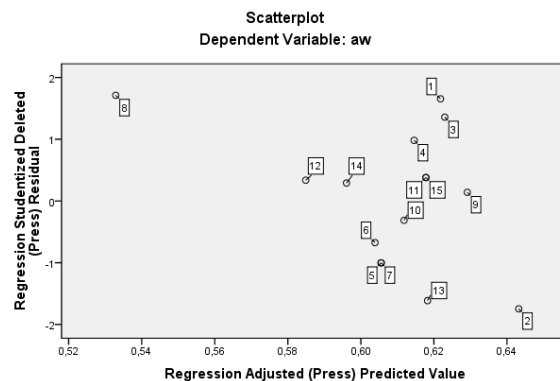
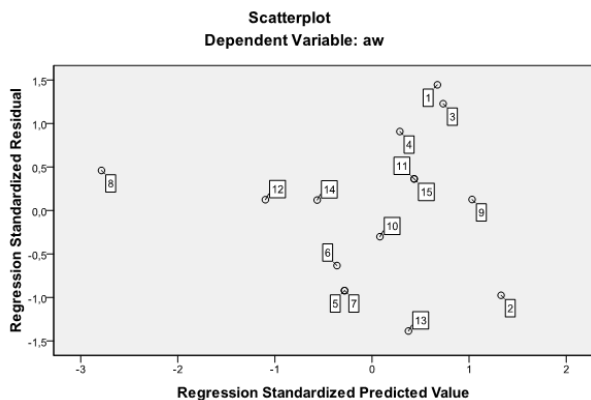
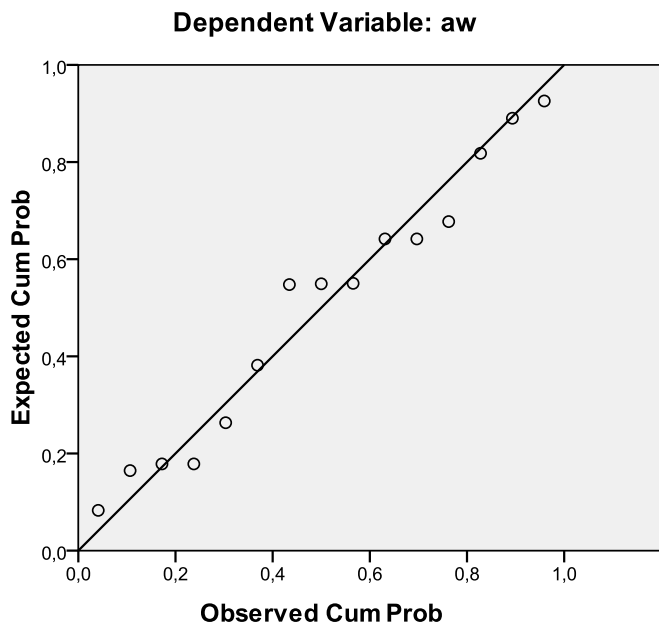
2) Pólen + pH

Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



Uma vez que pelo teste de distribuição (Kolmogorov-Smirnov) o valor de p (exacto) é 0,961 não rejeitamos a hipótese de que a variável segue uma distribuição normal para os habituais níveis de significância ($\alpha = 0,01; 0,05$ ou $0,1$). Desta forma foi-se determinar os *outliers*. Não se encontraram *outliers*.

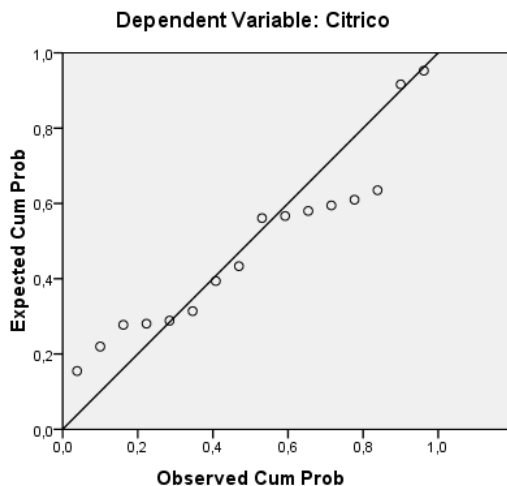
3) Pólen + a_w



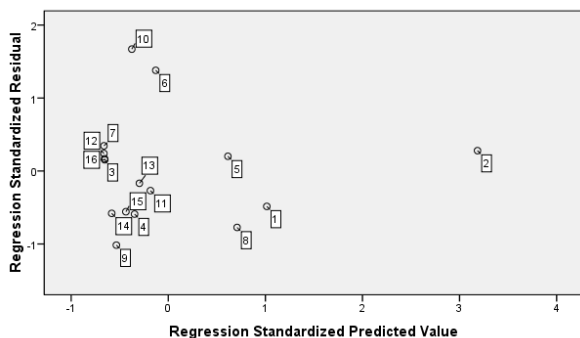
Uma vez que pelo teste de distribuição (Kolmogorov-Smirnov) o valor de p (exacto) é 0,578 não rejeitamos a hipótese de que a variável segue uma distribuição normal para os habituais níveis de significância ($\alpha = 0,01; 0,05$ ou $0,1$). Desta forma foi-se determinar os *outliers*. As amostras que tiveram $p < 0,1$ foram as amostras TER5 e TER6 e ALENT.

4) Pólen + Ácido Cítrico

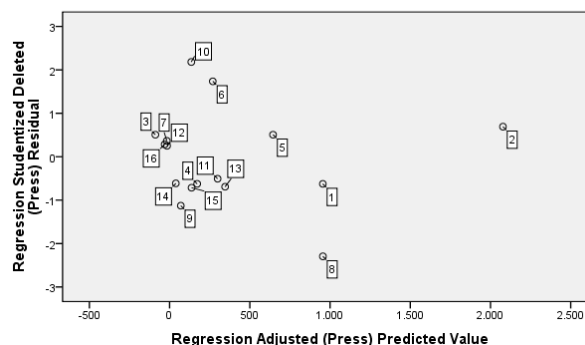
Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



Scatterplot
Dependent Variable: Citrico



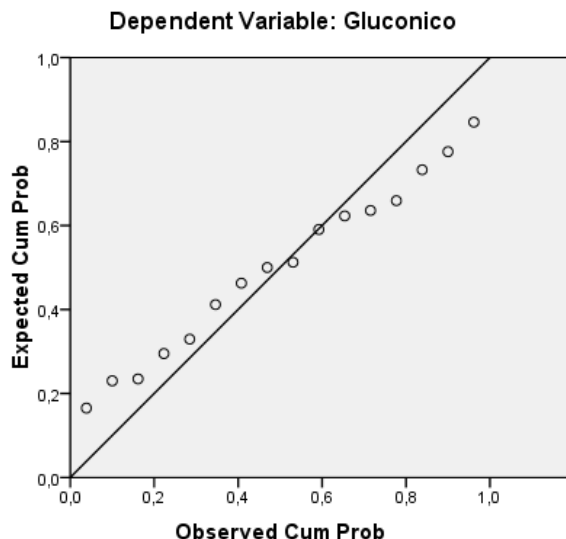
Scatterplot
Dependent Variable: Citrico



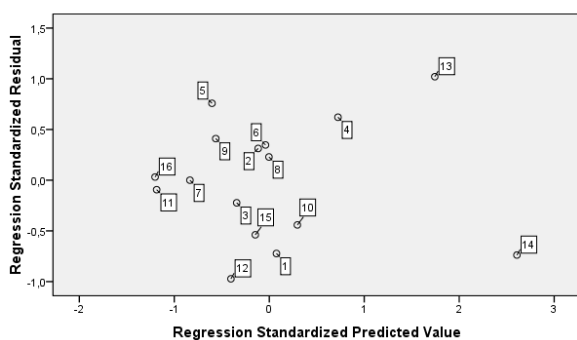
Uma vez que pelo teste de distribuição (Kolmogorov-Smirnov) o valor de p (exacto) é 0,768 não rejeitamos a hipótese de que a variável segue uma distribuição normal para os habituais níveis de significância ($\alpha = 0,01; 0,05$ ou $0,1$). Desta forma foi-se determinar os *outliers*. As amostras que tiveram $p < 0,05$ foram as amostras de SM1 e SM3.

5) Pólen + Ácido Glucónico

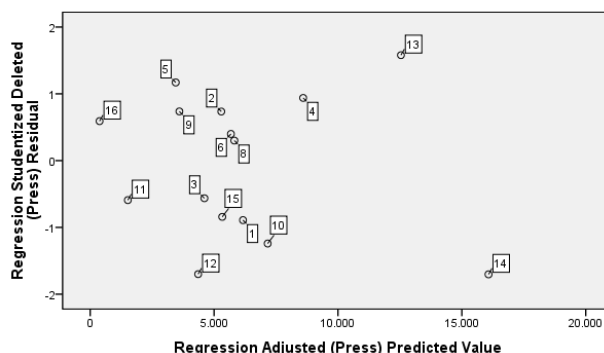
Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



Scatterplot
Dependent Variable: Gluconico



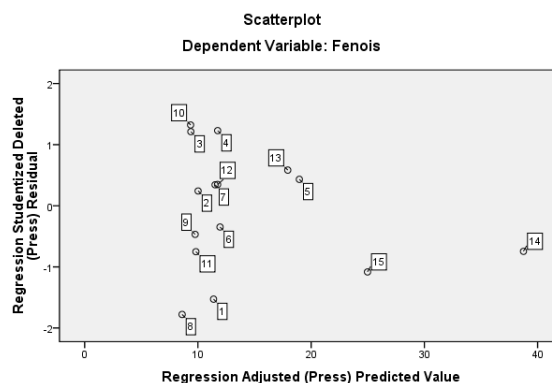
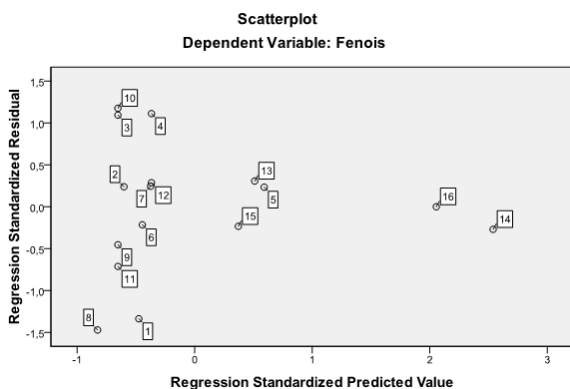
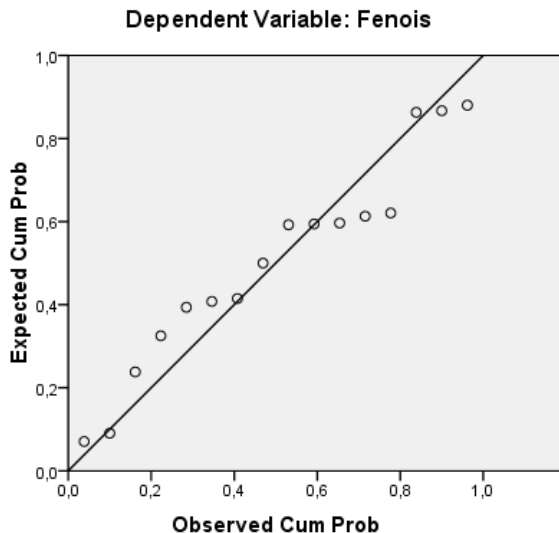
Scatterplot
Dependent Variable: Gluconico



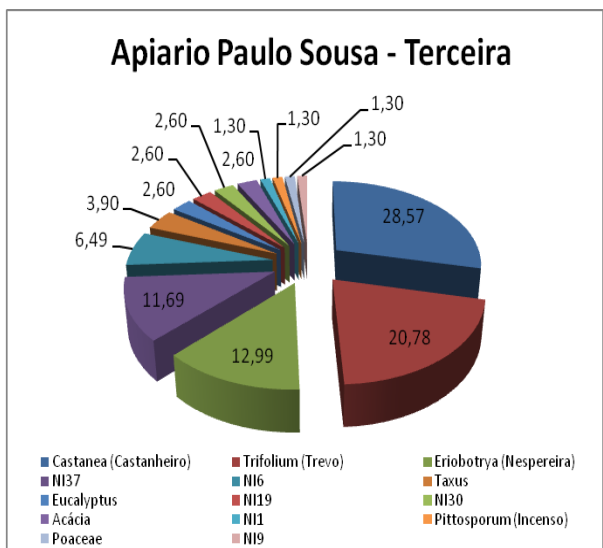
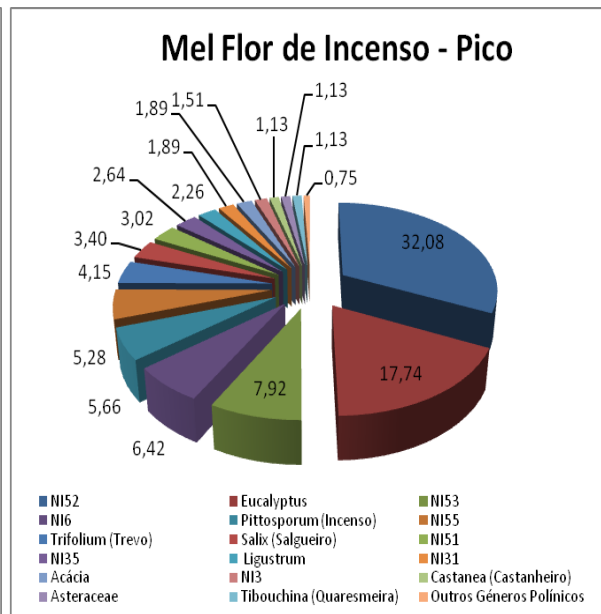
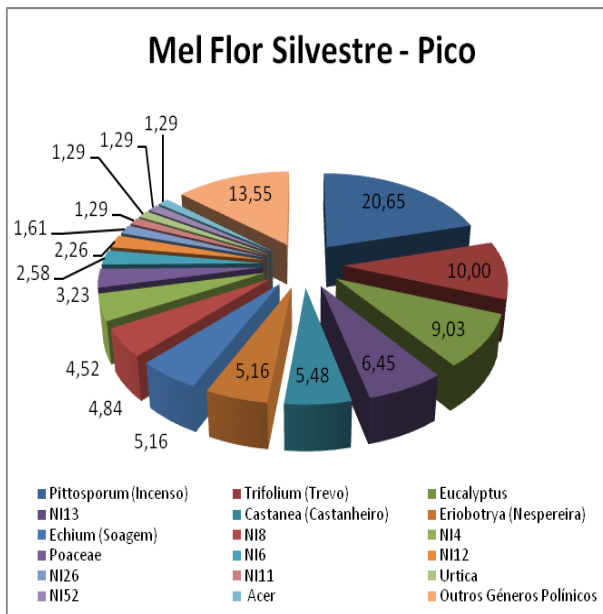
Uma vez que pelo teste de distribuição (Kolmogorov-Smirnov) o valor de p (exacto) é 0,944 não rejeitamos a hipótese de que a variável segue uma distribuição normal para os habituais níveis de significância ($\alpha = 0,01; 0,05$ ou $0,1$). Desta forma foi-se determinar os *outliers*. As amostras que tiveram $p < 0,1$ foram as amostras SM3 e TER5.

6) Pólen + Fenóis

Normal P-P Plot of Regression Standardized Residual



Uma vez que pelo teste de distribuição (Kolmogorov-Smirnov) o valor de p (exacto) é 0,919 não rejeitamos a hipótese de que a variável segue uma distribuição normal para os habituais níveis de significância ($\alpha = 0,01; 0,05$ ou $0,1$). Desta forma foi-se determinar os *outliers*. As amostras que tiveram $p < 0,1$ foram as amostras SM3 e ALENT.



ANEXO III - ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

Quadro 16 – Efeito da diluição (10%, 25%, 30%, 50%), da neutralização (25% e 50%) e da adição de catalase (25% e 50%) sobre a actividade antimicrobiana de vários méis contra o *Staphylococcus* 3DA. Os valores representam a média \pm SEM de 4 determinações.

AMOSTRAS	EQUIVALENTE ÍNDICE DE FENOL (%)							
	3DA							
	Efeito da Diluição				Efeito da Neutralização		Efeito da Catalase	
	10%	25%	30%	50%	25%	50%	25%	50%
Mel Quinta do Alem	6,596 \pm 0,000	17,502 \pm 0,518	21,213 \pm 0,304	22,508 \pm 0,991	6,596 \pm 0,000	28,013 \pm 0,369	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Mel Jubileu	6,596 \pm 0,000	17,780 \pm 0,665	20,125 \pm 1,392	21,213 \pm 0,304	6,596 \pm 0,000	15,481 \pm 0,466	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Mel Quintal dos Açores (1)	6,596 \pm 0,000	14,400 \pm 0,936	20,338 \pm 0,824	27,643 \pm 0,426	6,596 \pm 0,000	12,645 \pm 2,131	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Mel Cores	6,596 \pm 0,000	16,971 \pm 0,423	20,125 \pm 1,392	21,517 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	10,928 \pm 0,745	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Apiário Beatriz Afonso	2,410 \pm 0,000	4,336 \pm 0,371	9,431 \pm 0,679	20,283 \pm 0,581	5,879 \pm 0,302	21,343 \pm 0,910	5,871 \pm 0,361	21,500 \pm 0,921
Apiário Paulo Pavão	2,410 \pm 0,000	5,198 \pm 0,137	10,480 \pm 0,567	18,206 \pm 1,051	7,124 \pm 0,523	21,676 \pm 0,500	10,234 \pm 0,801	20,315 \pm 0,803
Mel Quintal dos Açores (2)	6,308 \pm 0,000	7,324 \pm 0,067	10,868 \pm 0,673	16,558 \pm 0,522	7,399 \pm 0,221	19,583 \pm 0,543	6,308 \pm 0,000	16,769 \pm 0,350
Mel Flor Silvestre	6,596 \pm 0,000	17,502 \pm 0,518	15,947 \pm 0,000	24,211 \pm 1,555	6,596 \pm 0,000	16,705 \pm 0,253	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Mel dos Açores - Fruter (1)	11,673 \pm 0,000	15,760 \pm 0,844	20,960 \pm 1,025	27,074 \pm 2,084	16,453 \pm 0,292	23,777 \pm 0,330	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Apiário Paulo Sousa	16,466 \pm 0,518	23,803 \pm 0,828	24,580 \pm 1,794	30,422 \pm 2,040	18,868 \pm 0,545	28,382 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Mel dos Açores - Fruter (2)	6,308 \pm 0,000	9,403 \pm 0,334	11,266 \pm 0,408	18,635 \pm 0,989	9,152 \pm 0,602	19,478 \pm 0,260	8,420 \pm 0,100	19,424 \pm 0,171
Mel dos Açores - Fruter (3)	6,505 \pm 0,000	8,896 \pm 0,256	11,655 \pm 0,267	18,039 \pm 0,684	7,556 \pm 0,015	20,105 \pm 0,239	8,929 \pm 0,252	17,115 \pm 0,291
Mel Pulo do Lobo	6,596 \pm 0,000	15,947 \pm 0,000	22,482 \pm 0,619	21,433 \pm 2,006	16,504 \pm 0,905	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Mel Serras do Algarve	13,810 \pm 1,234	17,633 \pm 0,515	17,754 \pm 0,266	28,790 \pm 0,965	20,299 \pm 0,000	26,905 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Mel Vinhais Trás-os-Montes	2,410 \pm 0,000	3,364 \pm 0,156	6,057 \pm 0,342	15,705 \pm 0,335	4,536 \pm 0,095	13,438 \pm 0,761	3,903 \pm 0,250	13,381 \pm 0,330
Mel Serra do Caramulo	2,410 \pm 0,000	4,953 \pm 0,187	8,635 \pm 0,814	17,735 \pm 1,534	5,158 \pm 1,266	18,536 \pm 0,816	5,368 \pm 0,154	17,884 \pm 1,715
Mel Quinta da Urgueira	6,596 \pm 0,000	14,082 \pm 0,000	20,338 \pm 0,824	21,213 \pm 0,304	15,947 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000
Active Manuka Honey	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	28,013 \pm 0,369	28,816 \pm 1,280	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000	6,596 \pm 0,000

Quadro 17 – Efeito da diluição (10%, 25%, 30%, 50%), da neutralização (25% e 50%) e da adição de catalase (25% e 50%) sobre a actividade antimicrobiana de vários méis contra o *Staphylococcus* 2LaQ. Os valores representam a média \pm SEM de 4 determinações.

AMOSTRAS	EQUIVALENTE ÍNDICE DE FENOL (%)							
	2LaQ							
	Efeito da Diluição				Efeito da Neutralização		Efeito da Catalase	
	10%	25%	30%	50%	25%	50%	25%	50%
Mel Quinta do Alem	11,577 \pm 0,000	16,062 \pm 0,000	21,906 \pm 0,000	27,988 \pm 1,121	29,109 \pm 0,000	19,806 \pm 1,284	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Mel Jubileu	12,698 \pm 1,121	16,606 \pm 0,544	21,906 \pm 0,000	26,921 \pm 1,711	26,187 \pm 1,776	16,327 \pm 0,265	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Mel Quintal Açores (1)	16,062 \pm 0,000	17,693 \pm 0,544	21,906 \pm 0,000	29,109 \pm 0,000	23,000 \pm 1,549	21,587 \pm 0,319	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Mel Cores	14,451 \pm 1,063	19,528 \pm 1,443	19,528 \pm 1,443	25,120 \pm 1,882	20,989 \pm 0,917	16,606 \pm 0,544	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Apiário Beatriz Afonso	51,917 \pm 0,479	79,436 \pm 1,717	85,137 \pm 0,724	79,466 \pm 2,447	52,993 \pm 1,163	56,670 \pm 1,238	52,892 \pm 1,169	57,028 \pm 1,822
Apiário Paulo Pavão	59,999 \pm 3,396	80,229 \pm 1,390	84,552 \pm 5,318	99,954 \pm 1,573	57,089 \pm 0,838	61,626 \pm 0,657	52,747 \pm 1,148	60,903 \pm 2,219
Mel Quintal Açores (2)	10,950 \pm 0,695	33,545 \pm 1,532	39,538 \pm 0,423	45,399 \pm 0,664	33,534 \pm 0,688	38,832 \pm 0,898	36,088 \pm 0,543	40,095 \pm 0,680
Mel Flor Silvestre	11,577 \pm 0,000	17,523 \pm 1,461	21,906 \pm 0,000	26,078 \pm 0,599	21,906 \pm 0,000	20,350 \pm 0,766	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Mel dos Açores (1)	13,820 \pm 1,295	19,528 \pm 1,443	26,160 \pm 1,548	31,250 \pm 2,141	16,062 \pm 0,000	26,438 \pm 0,374	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Apiário Paulo Sousa	21,906 \pm 0,000	22,946 \pm 1,040	26,479 \pm 1,117	32,384 \pm 0,688	32,867 \pm 1,648	19,806 \pm 1,284	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Mel dos Açores (2)	27,553 \pm 1,498	35,283 \pm 1,437	38,583 \pm 1,982	41,464 \pm 2,879	32,321 \pm 0,728	42,544 \pm 0,224	35,633 \pm 0,250	54,189 \pm 0,305
Mel dos Açores (3)	42,591 \pm 0,281	56,100 \pm 0,962	63,831 \pm 1,938	68,816 \pm 0,978	43,647 \pm 0,406	54,314 \pm 1,055	45,515 \pm 0,221	62,667 \pm 0,785
Mel Pulo do Lobo	12,698 \pm 1,121	21,906 \pm 0,000	23,319 \pm 1,413	29,109 \pm 0,000	21,322 \pm 1,075	17,204 \pm 1,142	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Mel Serras do Algarve	10,014 \pm 0,902	17,204 \pm 1,142	20,617 \pm 1,573	28,166 \pm 0,943	16,062 \pm 0,000	26,438 \pm 0,374	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Mel Trás-os-Montes	5,962 \pm 0,000	62,175 \pm 2,461	71,812 \pm 1,426	82,683 \pm 1,887	48,714 \pm 0,151	58,040 \pm 1,619	53,067 \pm 0,740	60,969 \pm 0,352
Mel Serra do Caramulo	50,188 \pm 0,541	67,860 \pm 0,000	67,912 \pm 2,211	86,221 \pm 2,160	44,595 \pm 0,391	50,090 \pm 0,323	46,522 \pm 0,603	54,581 \pm 0,664
Mel Quinta da Urgueira	11,577 \pm 0,000	21,906 \pm 0,000	21,906 \pm 0,000	27,308 \pm 1,801	19,806 \pm 1,284	16,062 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000
Active Manuka Honey	13,330 \pm 1,037	17,149 \pm 0,598	28,334 \pm 0,426	28,124 \pm 2,107	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000	6,250 \pm 0,000