



Qualidade dos Produtos Apícolas da Guiné Bissau: Mel e Própolis

Mélissa Andréa Lopes

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por
Miguel José Rodrigues Vilas Boas

Bragança
2014

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação, finaliza mais uma etapa da minha vida e com isto iniciar-se-á uma outra nova, deste modo não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que mais um sonho se concretiza-se.

“Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade.”

Raul Seixas

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Doutor Miguel Vilas Boas, por todo o conhecimento que me transmitiu, pelo tema que me sugeriu que me fez interessar pelo mundo da apicultura que de certa forma desconhecia. Pela paciência, dedicação, apoio, conselhos e disponibilidade permanente, pela amizade e boa disposição. Um muito obrigado!

Quero também agradecer à Doutora Soraia Falcão pelo apoio dado, pela ajuda prestada, pelos sábios conselhos e sugestões e pelas conversas nos momentos de pausa.

“À colega de laboratório”, Andreia Tomás que foi incansável durante todo este meu percurso, por toda a ajuda, pelo apoio, por tudo o que me ensinou e principalmente pela grande amizade que se construiu durante estes dois anos e que é fundamental para mim. Por todas as conversas e risadas que demos. Um muito obrigado!

A todos os elementos do laboratório de LQBA por me terem integrado e recebido tão bem! Às minhas meninas Carla, Ângela e Eliana, pelas conversas, amizade, pelos bons momentos passados e todo carinho. À minha flor Amanda que conquistou o coração de todos e tanta falta faz a sua presença. À minha afilhada Íngride por ser sempre tão carinhosa. Ao Márcio, à Sandrina, ao Zé, á Inês pela disponibilidade e afeto. À Doutora Isabel Ferreira, à Doutora Lillian, ao Doutor Ricardo e ao Doutor João pela simpatia e apoio concedido.

Ao Laboratório de Apicultura e Sericicultura, da Escola Superior de Agricultura da Universidade Aristóteles de Salónica, Grécia, um especial agradecimento ao Doutor Andreas Thrasyvoulou e à Doutora Maria Dimou.

Ao Tó pelo grande amigo e pessoa que é, por todos os momentos de riso e até de choro (que não foram poucos), por tudo o que me ensinou pelo apoio incondicional, por

todos os momentos divertidos passados, brincadeiras, por todo o carinho, pelos mimos dados, paciência, por ter ouvido os meus problemas e dilemas até as minhas “teorias” (que são reais)! Enfim por toda a amizade, um muito obrigado!

À minha princesa Cynthia, pela amizade, por ser uma pessoa tão doce, sempre disposta a defender-me, a ouvir-me e a apoiar-me com as palavras certas, por toda a alegria transmitida. Um muito obrigado!

À minha Leila, que começou por ser a minha companheira de casa e que com a sua amizade se tornou uma amiga para toda a vida, que apesar de não estar todos os dias presente me deu todo o apoio necessário para esta conquista.

À Azucena e à Marta pelos bons momentos passados, principalmente os passados em Salamanca que nos fazem desejar que o tempo volte atrás. À minha madrinha desta vida académica Isália que nunca se esqueceu de mim e tanta falta me faz.

A todos aqueles amigos e familiares que não referi mas que estão felizes pelo sucesso conseguido nesta importante etapa.

Aos meus padrinhos Arminda e Aníbal por todo o carinho.

Por fim quero agradecer às pessoas que mais amo! Aos meus pais Lurdes e Jorge e à minha maninha Mónica, pela força que me transmitiram, por todo o apoio, pela celebre frase “ Vai correr tudo bem, filhocas, tu consegues!”, que tanto me ajudou, por me terem ouvido quando mais precisei. Por toda a saudade, que por vezes até doía, por todo o tempo que não consegui estar perto. Sem vocês nada disto seria possível! Um muitíssimo obrigado!

Resumo

A colmeia é uma fonte de produtos nutritivos e com elevadas potencialidades farmacológicas, como o mel, o pólen, a cera, a geleia real, a apitoxina ou o pão de abelha. Neste trabalho destacamos o mel e a própolis da Guiné- Bissau avaliando a sua qualidade.

Na Guiné- Bissau, um país subdesenvolvido situado na costa Ocidental de África, os produtos provenientes da colmeia podem contribuir para o enriquecimento das condições nutricionais da população um problema que se vem mantendo ao longo dos tempos. Para minimizar este problema foi implementado no leste da Guiné-Bissau um projeto de desenvolvimento rural, EuropeAid/128139/L/ACT/GW “Valorização da Apicultura nas regiões de Bafatá e Gabú: produção, transformação e comercialização”. Este estudo foi integrado no seguimento deste projeto, efetuando-se a avaliação da qualidade de onze amostras de mel recolhidas em diferentes localidades nos anos de 2010 a 2013 e uma amostra de própolis do ano de 2010.

A origem floral do mel é habitualmente obtida através da avaliação do conteúdo polínico presente no mel, resultante do contacto do pólen com o corpo das abelhas durante a recolha do néctar na flor. A análise melissopalínológica das amostras de mel da Guiné-Bissau revelou a presença de um elevado número de grãos de pólen na generalidade das amostras, observando-se uma elevada diversidade, na sua maioria, pólen de *Rhizophora spp.*, *Terminalia macroptera*, *Mangifera indica*, *Cassia seberiana*, *Crinum spp.* e *Elaeis guineensis*. O elevado número de grãos de pólen é resultado do processo tradicional de extração de mel, o qual é realizado por prensagem e que provoca a passagem de uma quantidade significativa de pólen presente nos favos, para o mel. Por esta razão, a associação da origem floral com base nos resultados polínicos deverá ser efetuada com ponderação.

A avaliação dos parâmetros de qualidade do mel, realizada por aplicação das metodologias analíticas definidas pela Comissão Internacional do mel, evidenciaram um mel com uma predominância cromática de âmbar escuro, com teores de humidade compreendidos entre 16% e 20%, e uma condutividade variável entre 336 e 856 μScm^{-1} . Os teores em hidroximetilfurfural, um dos parâmetros mais relevantes na avaliação da qualidade do mel, apresentaram valores significativamente altos, o que poderá implicar deficiências no processo de produção e conservação. Os resultados para a acidez livre, determinada no ponto de equivalência, oscilam entre os 16 e 45 meqkg^{-1} , enquanto através da determinação a pH 8,3 os valores sobem para 22 a 61 meqkg^{-1} , ultrapassando neste caso os limites máximos admitidos. Para a diastase os valores encontram-se entre os 9 e 27 DN, e para a prolina oscilam entre os 0,29 mgg^{-1} e os 1,18 mgg^{-1} , o que revela estarmos perante

amostras de mel maduras e não adulteradas. A análise da matéria insolúvel revelou valores significativos até um máximo de 0,33%, o que se ficará a dever aos procedimentos de extração do mel. A análise do perfil em açúcares, efetuada por cromatografia, permitiu identificar a presença dos monossacáridos de frutose, glucose, e dissacarídeos turanose, maltulose, maltose e trealose. A sacarose foi apenas detetada numa das amostras em quantidades inferiores a 1%. A quantificação dos açúcares permitiu classificar todos os méis como méis de néctar.

Para além dos parâmetros físico-químicos, as amostras de mel foram avaliadas no teor em compostos fenólicos e na sua atividade antioxidante através do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e do poder redutor. O teor em fenóis totais variou entre um máximo de 0,85 e um mínimo de 0,25 mgGAEg⁻¹, enquanto para a capacidade bloqueadora de radicais os valores de EC₅₀ oscilaram entre 10 e 61 mgmL⁻¹. Para o poder redutor as amostras oscilaram entre 0,6 e 3,0 mgGAEg⁻¹.

A avaliação da amostra de própolis apresentou para a cor uma componente de luminosidade de 36, uma componente cromática a* de 5 e b* de 15 e uma componente C*ab de 16, definindo a sua cor castanha clara. Ao nível dos parâmetros físico-químicos a amostra apresentou um teor de água de 3,9%, um teor de cinzas de 4% e um teor de ceras bastante elevado, 38%, comparativamente à própolis Europeia (<31%). Esta diferença pode ser justificada pela diferença na origem floral ou pelo processo de recolha.

Para avaliar a componente fenólica e atividade antioxidante da própolis recorreu-se a uma extração etanólica da amostra, obtendo-se um conteúdo balsâmico reduzido de 26%. Os teores em fenóis totais e flavonóides neste extrato revelaram-se também significativamente baixos, o que se refletiu na atividade antioxidante quer ao nível do efeito bloqueador de radicais livres DPPH quer para o poder redutor.

Considerando os resultados obtidos é evidente a diferença na composição do mel e própolis da Guiné-Bissau quando comparado com as características destes produtos com origem na Europa, o que se associa às características climáticas e botânicas da região. Ao nível dos parâmetros qualitativos do mel, verifica-se uma evolução ao longo dos anos de implementação do projeto, no entanto, o esforço na melhoria das condições de produção deverá ser continuado.

Palavras- chave: Mel, própolis, propriedades físico-químicas, análise polínica, atividade antioxidante.

Abstract

The hive is a source of nutritional products with high pharmacological potentialities, such as honey, pollen, beeswax, royal jelly, bee venom or the bee bread. In this paper we highlight the honey and propolis from Guinea-Bissau assessing their quality.

In Guinea-Bissau, a developing country on the west coast of Africa, the products from the beehive can contribute to the enrichment of the nutritional status of the population, a problem that has been kept over the years. To minimize this handicap, a project of rural development named, EuropeAid / 128139 / L / ACT / GW "Promotion of beekeeping practices in regions of Gabú and Bafatá: production, processing and marketing" was implemented in the eastern part of Guinea-Bissau. The goal of the current study was embedded in that project, and was based on the quality assessment of eleven samples of honey, collected in different location through the years of 2010 to 2013, together with a sample of propolis from 2010.

The floral origin of honey is usually assessed by evaluating the content of the pollen present in honey, resulting from the contact of the honeybee body while collecting nectar in the flower. The melissopalynological analysis of honey samples from Guinea-Bissau revealed the presence of a large number of pollen grains in most of the samples, mostly often pollen of *Rhizophora spp.*, *Terminalia macroptera*, *Manguifera indica*, *Cassia siberiana*, *Crinum spp.* and *Elaeis guineensis*. The observed high counting of pollen grains is the result of the traditional process for extraction of honey, which is performed by physical pressing, what causes the passage of a significant amount of pollen from the combs to the honey. For this reason, the correlation of floral origin based on pollen results must be made carefully.

The evaluation of the honey quality parameters, performed by application the analytical methodologies defined by the International Honey Commission, honey highlighted a predominance of dark amber color honeys, with a moisture content ranging between 16% and 20%, and a variable conductivity between 336 and 856 μScm^{-1} . The levels of hydroxymethylfurfural, one of the most important parameters in evaluating the quality of honey, showed high values, which may lead to deficiencies in the production and conservation methods. The results for free acidity, determined at the equivalence point, oscillate between 16 and 45 meqkg^{-1} , while at pH 8.3 the values increased to 61 meqkg^{-1} , in some cases exceeding the maximum allowed limits. For diastase, the results revealed a variation from 9 to 27 DN, and proline levels ranging between 0,29 mgg^{-1} and 1,18 mgg^{-1} , which shows that we are facing samples of mature and unadulterated honey. The insoluble

matter analysis revealed significant amounts of residues to a maximum of 0,33%, which can be explained due to the honey extraction procedures. The sugar profile analysis, performed by chromatography, identified the presence of the monosaccharides fructose, glucose, the disaccharides turanose, maltulose, maltose, and trehalose. Sucrose was detected only in one sample in amounts below 1%. Quantification of sugars allowed to classify all the honeys as nectar honeys.

In addition to the physical-chemical parameters, the honey samples were evaluated in the content of phenolic compounds and their antioxidant activity through the scavenging effect of free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and reducing power. The content of total phenols vary between a maximum of 0,85 and a minimum of 0,25 mgGAEg⁻¹, while for the scavenging effect, expressed by the EC₅₀, ranged between 10 and 61 mgmL⁻¹. For the reducing power the samples ranged between 0,6 and 3,0 mgGAEg⁻¹.

The color evaluation of the propolis sample showed a brightness component of 36, with a chromatic component for a* of 5, b* of 15 and a 16 C*ab, defining their color as light brown. In terms of physical-chemical parameters the sample presented a water content of 3.9%, 4% of ashes, and a very high wax content, 38%, when compared to European propolis (<31%). This difference may be explained by differences in the floral origin of propolis or in the collection procedure.

To evaluate the phenolic component and antioxidant activity the propolis was first extracted in ethanolic solution giving a reduced balsamic content of 26%. The amount of total phenolics and flavonoids in the extract were found to be significantly low, which is reflected in both the antioxidant activity verified by the scavenging effect of DPPH and the reducing power.

Considering these results, it is evident the difference in the composition of honey and propolis from Guinea-Bissau comparing with the same products from Europe, which can be explained by the differences in climate and botanical features of the regions. In terms of qualitative parameters of honey, there is a clear evolution over the years of project implementation, however, the effort to improve the productions conditions should be continued.

Key- words: Honey, propolis, physicochemical properties, pollen analysis, antioxidant activity.

Resumen

La Colmena es una fuente de productos nutricionales y alto potencial farmacológico, como la miel, polen, cera, jalea real, veneno de abeja o el pan de abejas. En este trabajo se destaca la miel y el propóleo Guinea-Bissau la evaluación de su calidad.

En Guinea-Bissau, un país en desarrollo en la costa Oeste de África, los productos de la colmena puede contribuir al enriquecimiento de la situación nutricional de la población es un problema que ha mantenido a lo largo de los años. Para minimizar este problema, un proyecto de desarrollo rural, EuropeAid / 128139 / L / ACT / GW " : la producción, transformación y comercialización valorando regiones apícolas de Gabú y Bafatá" se implementó en el este de Guinea-Bissau. Este estudio se ha incrustado en la raíz de este proyecto, se realizó la evaluación de la calidad de once muestras de miel recogidas en diferente lugar en los años 2010 a 2013 y una muestra de propóleos en 2010.

El origen floral de la miel se obtiene normalmente mediante la evaluación del contenido de los pólenes presentes en la miel, el polen, resultante del contacto con el cuerpo de la abeja mientras que la recolección de néctar en la flor. El análisis de muestras de miel melissopalínológica desde Guinea-Bissau reveló la presencia de un gran número de granos de polen en la mayoría de las muestras, se observó una alta diversidad, mayormente polen de *Rhizophora spp.*, *Terminalia macroptera*, *Manguijera indica*, *Cassia seberiana*, *Crinum spp.* y *Elaeis guineensis*. El elevado número de granos de polen es el resultado del proceso tradicional para la extracción de la miel, que se realiza presionando y haciendo que el paso de una cantidad significativa de este polen en los panales, para la miel. Por esta razón, la asociación de origen floral basado en resultados de polen debe hacerse cuidadosamente.

La evaluación de los parámetros de calidad de la miel, realizado mediante la aplicación de metodologías de análisis definidos por la Comisión Internacional de la miel, miel de relieve con un predominio del color ámbar oscuro, con un contenido de humedad de entre el 16% y el 20%, y una conductividad variable entre 336 y 856 μscm^{-1} . Los niveles de hidroximetilfurfural, uno de los parámetros más importantes en la evaluación de la calidad de la miel, mostraron valores significativamente más altos, que pueden dar lugar a deficiencias en los métodos de producción y de conservación. Resultados para acidez libre, determinado en el punto de equivalencia, oscilan entre 16 y 45 meqkg^{-1} , mientras que mediante la determinación al pH 8,3 los valores aumentan a 61 meqkg^{-1} , en este caso superior a los límites máximos permitidos. Para diastasa los valores se encuentran entre 9 y 27 DN, y prolina que oscila entre 0,29 mgg^{-1} y 1,18 mgg^{-1} , lo que demuestra que estamos frente a muestras de miel madura y sin adulterar. El análisis reveló materia insoluble

cantidades significativas a un máximo de 0,33%, que será debido a los procedimientos de extracción de miel. El análisis del perfil de azúcar, realizado por cromatografía identificó la presencia de monosacáridos fructosa, glucosa, disacáridos y turanosa, maltulosa, maltosa y trehalosa. La sacarosa sólo se detectó en las muestras en cantidades por debajo de 1%. La cuantificación de los azúcares permitió clasificar a todas las mieles como mieles de néctar.

Además de los parámetros físico-químicos, se evaluaron las muestras de miel en el contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante a través del efecto de bloqueo de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y poder reductor. El contenido de fenoles totales varían entre un máximo y un mínimo de 0,85-0,25 mgGAEg⁻¹, mientras que para los radicales capacidad de bloqueo valores de EC₅₀ oscilaron entre 10 y 61 mgmL⁻¹. Para el poder reductor de las muestras osciló entre 0,6 y 2,8 mgGAEg⁻¹.

La muestra de evaluación hecho de propóleo por una fuente de luz de color componente 36, un componente de color a* y b* de 5 de los 15 y un C*ab componente de 16, la definición de su color marrón claro. En cuanto a los parámetros físico-químicos de muestra tenía un contenido de agua del 3,9%, un contenido de cenizas de un 4%, y un muy alto contenido de ceras, el 38% en comparación con propóleos europeos (<31%). Esta diferencia puede explicarse por diferencias en origen floral o el proceso de recolección.

Para evaluar el componente fenólico y la actividad antioxidante de propóleos se gira a una extracción etanólica de la muestra para obtener un contenido reducido de vinagre 26%. Se encontró que las cantidades de fenoles totales y flavonoides en el extracto a ser significativamente demasiado baja, lo que se refleja tanto en la actividad antioxidante del efecto de bloqueo de los radicales libres DPPH nivel ya sea para reducir la potencia.

Teniendo en cuenta estos resultados, es evidente la diferencia en la composición de la miel y el propóleo de Guinea-Bissau en comparación con las características de estos productos originarios de Europa, que se ha correlacionado con características climáticas y botánicas de la región. En cuanto a los parámetros cualitativos de la miel, hay una evolución a lo largo de los años de ejecución del proyecto, sin embargo, se continuará el esfuerzo para mejorar las condiciones de producción.

Palabra- clave: Miel, propóleo, propiedades físico-químicas, análisis de polen, actividad antioxidant.

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Resumen	ix
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas.....	xvi
Abreviaturas e Símbolos.....	xvii

Capítulo I - Introdução

1. Introdução	3
1.1. Pólen.....	4
1.2. Cera.....	5
1.3. Geleia Real	6
1.4. Veneno de abelha (apitoxina)	6
1.5. Mel	7
1.5.1. Composição.....	8
1.5.1.1. Espectro polínico	8
1.5.1.2. Composição química.....	9
1.5.2. Propriedades bioativas do mel.....	11
1.5.3. Controlo de qualidade	12
1.6. Própolis.....	14
1.6.1. Composição.....	15
1.6.2. Propriedades bioativas da própolis.....	15
1.7. Objetivos.....	17

Capítulo II - Material e Métodos

2. Material e Métodos	21
2.1. Amostragem	21
2.2. Análise do mel	23
2.2.1. Análise polínica.....	23
2.2.2. Cor.....	23
2.2.3. Matéria insolúvel.....	24
2.2.4. Humidade	24
2.2.5. Condutividade	25
2.2.6. pH, acidez livre e acidez lactónica.....	25
2.2.7. Hidroximetilfurfural	26
2.2.8. Índice diastásico	27
2.2.9. Prolina	27
2.2.10. Açúcares	28
2.2.11. Conteúdo fenólico - Fenóis totais.....	29
2.2.12. Atividade antioxidante	30
2.2.12.1. Efeito bloqueador de radicais livres.....	30
2.2.12.2. Poder redutor.....	31
2.3. Análise da própolis	32
2.3.1. Índice de cor.....	32
2.3.2. Teor de água.....	33
2.3.3. Teor de cinzas.....	33
2.3.4. Teor de cera.....	33
2.3.5. Conteúdo fenólico	33
2.3.5.1. Extração	33
2.3.5.2. Fenóis totais	34
2.3.5.3. Flavonas e flavonóis	34

2.3.5.4.	Flavanonas e di-hidroflavonóis.....	35
2.3.6.	Atividade antioxidante	35
2.3.6.1.	Efeito bloqueador de radicais livres.....	35
2.3.6.2.	Poder redutor.....	36
2.4.	Análise estatística.....	36
Capítulo III - Resultados e Discussão		
3.	Resultados e Discussão	39
3.1.	Mel	39
3.1.1.	Análise polínica.....	39
3.1.2.	Cor.....	43
3.1.3.	Matéria insolúvel.....	44
3.1.4.	Humidade	45
3.1.5.	Condutividade elétrica.....	45
3.1.6.	Acidez.....	46
3.1.7.	Hidroximetilfurfural (HMF).....	48
3.1.8.	Índice diastásico	49
3.1.9.	Prolina	50
3.1.10.	Açúcares	50
3.1.11.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	55
3.1.11.1.	Fenóis Totais	56
3.1.11.2.	Efeito bloqueador de radicais livres.....	57
3.1.11.3.	Poder Redutor	58
3.2.	Própolis.....	59
3.2.1.	Cor.....	59
3.2.2.	Teor de água.....	60
3.2.3.	Teor de ceras	61
3.2.4.	Teor cinzas	61

3.2.5. Conteúdo fenólico	61
3.2.5.1. Fenóis Totais	62
3.2.5.2. Flavonóides	63
3.2.6. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	63
Capítulo IV - Conclusão	
4. Conclusão.....	67
Capítulo V - Referências Bibliográficas	
5. Referências Bibliográficas.....	73
Capítulo VI - Anexos	
6. Anexos	85

Índice de Figuras

Figura 1- a) <i>Apis mellífera adansonii</i> ; b) Colmeia de palha; c) Colmeia queniana implementada na Guiné-Bissau.....	3
Figura 2 - Mel.....	8
Figura 3- Propólis.....	14
Figura 4- Origem geográfica das amostras de mel e própolis.....	21
Figura 5- Amostras em estudo: a) mel; b) própolis.....	22
Figura 6- Estrutura química do hidroximetilfurfural	26
Figura 7- Redução do DPPH.....	30
Figura 8- Equações da redução do complexo Fe^{3+} /ferrocianeto à sua forma ferrosa.	31
Figura 9- Plantas representadas na análise melissopalínológica.....	41
Figura 10- Cromatogramas relativos à análise dos açúcares	52
Figura 11- (a) Reta de calibração para o padrão ácido gálico; (b) Teor em fenóis totais no mel.....	56
Figura 12- Valores de EC_{50} para as amostras de mel.....	57
Figura 13- Poder redutor das amostras de mel.....	58
Figura 14- Sistema de cor CIELAB.	60
Figura 15- Teor em fenóis totais: padrão de ácido cafeico:galangina:pinocembrina	63
Figura 16- Comunicação em painel, III Congresso Ibérico de Apicultura.	90

Índice de Tabelas

Tabela 1- Legislação internacional para a qualidade do mel.	13
Tabela 2- Origem geográfica e ano de cresta das amostras.	22
Tabela 3- Intervalo de concentrações referente a cada um dos padrões e respectivas retas de calibração, e coeficientes de correlação.	29
Tabela 4- Classificação dos méis de acordo com a quantificação dos elementos de plantas (pólen e elementos de melada (HDE))	40
Tabela 5- Análise melissopalínológica.....	42
Tabela 6- Parâmetros físico-químicos: cor, matéria- insolúvel, humidade e condutividade.	43
Tabela 7- pH e acidez das amostras de mel.....	47
Tabela 8- Parâmetros físico-químicos do mel: HMF; índice diastásico e prolina.	49
Tabela 9- Perfil do mel em açúcares, obtido por HPLC. Valores expressos em g/100g de mel.....	54
Tabela 10- Atividade antioxidante: Fenóis totais, DPPH e Poder redutor.	55
Tabela 11- Parâmetros físico-químicos da própolis.....	59
Tabela 12- Conteúdo balsâmico, conteúdo fenólico e atividade antioxidante da própolis.	62
Tabela 13- Análise melissopalínológica.....	86

Abreviaturas e Símbolos

Abs- absorvância

DAD - detetor de matriz de díodos

DNP- 2,4-dinitrofenilhidrazina

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

GAE- Equivalentes em ácido gálico

g- grama

HDE- Elementos de melada

HPLC- Cromatografia líquida de alto desempenho

HMF- Hidroximetilfurfural

IHC- Comissão Internacional do mel

RI- Índice de refração

m- massa

nm- nanómetro

P- Pólen

rpm- Rotações por minuto

SPSS- Software estatístico

ϕ - porosidade

Capítulo I

Introdução

1.1.Pólen

1.2.Cera

1.3.Geleia Real

1.4.Veneno de abelha

1.5.Mel

1.6.Própolis

1.7.Objetivos



1. Introdução

A apicultura é uma atividade agrícola de gestão e criação de abelhas com o objetivo de recolher produtos apícolas, em particular o mel. São, no entanto, cada vez mais diversos os produtos apícolas explorados,¹ como, o mel, a própolis, o pólen, a cera, a geleia real, o veneno de abelha (apitoxina) e o pão de abelha. Os produtos apícolas são amplamente utilizados desde os tempos antigos na dieta humana e medicina popular devido às suas propriedades nutricionais e farmacológicas.² A maioria da apicultura do mundo é feita com a espécie de abelha *Apis mellífera*.³

Na Guiné-Bissau, um país subdesenvolvido na região Oeste de África, a apicultura tem como principal função promover o desenvolvimento rural mas também contribuir para a melhoria das condições nutricionais da população. Esta atividade é nos dias de hoje realizada ainda numa base tradicional, recorrendo a colmeias de palha e de olmo, Figura 1b, penduradas pelos apicultores das aldeias no cimo das árvores e destruídas anualmente após a época seca para recolha do mel. Nesta região de África em particular a subespécie de abelha predominante é a *Apis mellífera adansonii*, Figura 1a. A cresta é realizada por destruição da colmeia, e prensagem dos favos, muitas vezes com recurso ao fogo e água para facilitar o processo de extração. O produto resultante é por isso de baixa qualidade contendo um elevado número de resíduos, tais como cera, larvas de abelhas, e muitas vezes apresenta um estado de fermentação avançado. A aplicação de novas tecnologias de produção, Figura 1c, que garantam a segurança dos alimentos e a obtenção de produtos de qualidade é um passo basilar no desenvolvimento da atividade apícola e na melhoria de condições nutricionais das populações rurais da Guiné-Bissau.



Figura 1- a) *Apis mellífera adansonii*; b) Colmeia de palha; c) Colmeia queniana implementada na Guiné-Bissau.

Este trabalho vem na sequência do projeto de desenvolvimento rural EuropeAid/128139/L/ACT/GW “Valorização da Apicultura nas regiões de Bafatá e Gabú: produção, transformação e comercialização” e pretende avaliar a qualidade do mel e da própolis desta região, obtido através da melhoria das condições de produção de mel. De seguida efetua-se uma breve descrição dos diversos produtos da colmeia, ricos em propriedades nutricionais devido à enorme variedade de compostos químicos que cada um destes produtos dispõe.

1.1. Pólen

Os grãos de pólen são estruturas microscópicas encontradas nas anteras de estames nas angiospermas, e constituem as células reprodutivas masculinas nas plantas, com a finalidade de transmitir os seus gametas para o órgão sexual feminino da flor.⁴ O pólen, em conjunto com o néctar, são os alimentos principais das abelhas, que, por este motivo, possuem órgãos de recolha especializados para cada um destes substratos. A armadura bucal está adaptada à sucção de néctar e as patas para a recolha de pólen, que é compactado em grãos, chamados “cargas polínicas”. Esta compactação é possível com o auxílio do néctar. As abelhas não consomem o pólen diretamente no local da colheita, mas transportam-no e armazenam-no no interior da colmeia. Devido a este comportamento é possível recolher o pólen que as abelhas transportam através de um dispositivo chamado “caça-pólen” colocado à entrada da colmeia. As abelhas são forçadas a entrar para a colmeia, passando por uma rede de orifícios de tamanho ligeiramente superior ao do seu corpo, o que provoca a queda das cargas polínicas que transportam nas corbículas das patas traseiras para uma gaveta colocada debaixo da entrada da colmeia. Como o pólen é a principal fonte de proteínas para as abelhas e para as larvas, uma dada percentagem dos orifícios do caça-pólen permite a entrada de uma parte da colheita.⁵

A composição do pólen apícola depende fortemente da sua origem vegetal, mas também de outros fatores como as condições climáticas, tipo de solo e época de recolha. O pólen apícola é rico em hidratos de carbono (13 a 15%), fibras (0,3 a 20%), proteínas (10 a 40%) e lípidos (1 a 10%) conferindo-lhe por isso excelentes potencialidades nutricionais, não apenas para as abelhas, mas também para o consumo humano, pois

contém todos os aminoácidos essenciais. Além disso, há vários relatos que o associam com efeitos benéficos na prevenção de problemas da próstata, arteriosclerose, gastroenterite, doenças respiratórias, alergias dessensibilização, melhoria dos sistemas cardiovascular e digestivo e atraso do envelhecimento. Estes efeitos terapêuticos e protetores são atribuídos ao teor de polifenóis.⁶ A maior limitação do pólen apícola como fonte de nutrientes está associada à sua baixa digestibilidade, pelo que uma vez no interior da colmeia, as abelhas adicionam mel e enzimas digestivas antes do armazenamento nos favos, dando início a uma fermentação láctica que lhe confere maior poder de conservação e aumenta a biodisponibilidade dos nutrientes. Este pólen adquire características nutricionais distintas e pode também ser comercializado como “pão de abelha”. A tecnologia para a extração de “pão de abelha” consiste na recolha dos favos com pólen, secagem, arrefecimento, segmentação, separação em grânulos de “pão de abelha” e cera.⁷ Uma das contribuições para o seu elevado valor nutritivo deve-se à presença de uma quantidade significativa de vitaminas e compostos fenólicos, que como antioxidantes naturais, são responsáveis por muitas das suas propriedades biológicas.

1.2. Cera

A cera é outro dos produtos da colmeia, este de origem animal, obtido pela secreção das glândulas ceríferas das abelhas obreiras com idades compreendidas entre os 12 e os 18 dias. É um produto de cor branca, se bem que por vezes apresenta uma cor amarela devido ao contato do mel, do pólen e da própolis.⁸ As abelhas usam a cera para a construção do favo, servindo para o armazenamento de pólen e mel e para a gestação das abelhas. No interior da colmeia a temperatura tem de rondar os 33 a 36°C para que esta seja formada. É composta maioritariamente por uma mistura de ácidos gordos, ceroleína, vitamina A e outras substâncias com diferentes propriedades bactericidas, emolientes, cicatrizantes e anti-inflamatórias. É por isso comum a sua aplicação na indústria cosmética e farmacêutica.^{8,9}

1.3. Geleia Real

A geleia real, também um produto de origem animal, é uma secreção amarelada e cremosa produzida pelas obreiras e utilizado na nutrição de larvas de abelha. A produção ocorre a partir do sistema glandular cefálico (hipofaringe e glândulas mandibulares) das abelhas jovens entre o 5º e o 14º dia de vida. Após este tempo, a secreção cessa pela atrofia natural das glândulas. Todas as larvas numa colônia são alimentadas a partir da geleia real até ao terceiro dia, mas depois apenas as larvas da rainha continuam a receber a geleia real, bem como a abelha-mestra que vive exclusivamente alimentando-se desta substância. A geleia real desempenha um papel específico e importante no desenvolvimento das abelhas rainha conferindo-lhe um desenvolvimento fisiológico que a distingue de todas as restantes abelhas da colônia.

Quimicamente, a geleia real é constituída por água (60-70%), proteínas (12-15%), hidratos de carbono (7-18%), ácidos gordos (3-8%) e pequenas quantidades de vitaminas (vitaminas do complexo B, vitamina C, vitamina E), aminoácidos livres e sais minerais (cobre, zinco, ferro, cálcio, manganês, potássio e sódio). As particularidades da composição deste produto apícola potenciam inúmeras aplicações em dietética, cosmética, produtos farmacêuticos e alimentos saudáveis, pelo que o seu consumo é hoje muito associado a suplementos dietéticos considerando os benefícios associados à saúde, como a regulação da imunidade, anti-envelhecimento, redução do colesterol, inibição da vascularização do tumor, cicatrização de feridas, antibiótico e efeitos hepatoprotetores.¹⁰

1.4. Veneno de abelha (apitoxina)

O veneno de abelha possui diversas atividades biológicas e farmacológicas, estando demonstrada a sua eficácia no tratamento de condições patológicas como a artrite, o reumatismo, a dor, tumores cancerosos e doenças de pele. No entanto, porque o veneno de abelha é uma toxina, e a fim de desenvolver formulações farmacêuticas para a sua administração segura, é necessária uma informação detalhada sobre a sua toxicologia, os efeitos colaterais e a composição química.¹¹

Nas abelhas, a glândula secretora de veneno consiste num filamento unido na sua porção proximal para o reservatório, que se abre para o ferrão. A secreção no lúmen

glandular e no reservatório é alcalina, mas torna-se ácida após secreção. Como noutras glândulas exócrinas, o ciclo de desenvolvimento das glândulas de veneno de *A. mellifera* inclui uma fase ativa, seguido por uma fase de regressão. As análises bioquímicas mostram que, durante a fase ativa, a glândula de veneno da *A. mellifera* segrega uma mistura de, pelo menos, 50 componentes identificados, a maioria dos quais têm um efeito tóxico sobre várias espécies de insetos e invertebrados, incluindo, hialuronidase, fosfolipase A, fosfatase ácida, esterases, histamina, melitina, dopamina e noradrenalina, todos presentes em concentrações farmacologicamente significativas.¹² A recolha do veneno de abelha é realizada através de eletroestimulação das abelhas colocando-se um dispositivo eletrónico na entrada da colmeia, o qual, através de pequena voltagem, promove o ataque das abelhas ao dispositivo. No decorrer deste ataque as abelhas libertam o veneno sobre uma placa de vidro não causando qualquer impacto negativo na abelha, uma vez que o ferrão é retraído sem danos.

1.5. Mel

O mel é uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas a partir do néctar de flores, de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam no favo de mel para amadurecer, Figura 2.¹³ É um género alimentício produzido em quase todas as partes do mundo e em grande parte utilizado como fonte de alimento. O mel não pode ser considerado como um alimento completo para os padrões nutricionais humanos, mas oferece um potencial como um suplemento dietético.¹⁴ É um alimento funcional, descrito, como antibacteriano, bacteriostático, anti-inflamatório, possui efeitos curativos em feridas e queimaduras solares, é antioxidante, elimina radicais e possui atividade antimicrobiana.¹⁵



Figura 2 - Mel. (fonte: www.flickr.com)

1.5.1. Composição

A qualidade do mel é determinada pelas suas propriedades sensoriais, físicas e químicas¹⁶ as quais são fortemente influenciadas pelas plantas de onde é recolhido o néctar, pelo clima, pelas condições ambientais em redor do apiário e também pela ação do apicultor na gestão das colónias.⁸

Os principais constituintes do mel são os açúcares simples ou monossacarídeos, particularmente a frutose e a glucose, e conjuntamente a água, no entanto, podem encontrar-se também outros constituintes em menor proporção como as proteínas, aminoácidos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, vitaminas e minerais. O mel disponível comercialmente em todo o mundo varia muito em termos de qualidade. A análise das propriedades físico-químicas do mel e a composição polínica são utilizadas internacionalmente para verificar a autenticidade do produto, e para revelar a eventual presença de componentes artificiais ou adulterações.⁹

1.5.1.1. Espetro polínico

O método padrão de classificação da origem botânica do mel e em alguns casos, a sua origem geográfica, é a análise polínica do mel, considerando que o pólen residual que se encontra no mel tem origem nas flores visitadas pelas abelhas no processo de

recolha do néctar. Esta técnica, denominada de melissopalinologia (identificação de pólen) é tediosa e tem algumas limitações. Uma dificuldade particular é que a melissopalinologia requer um conhecimento prévio de morfologia polínica e de profissionais especializados para obter resultados de reconhecimento confiáveis.¹⁷

Um mel de néctar é classificado como monofloral quando o conteúdo polínico provém principalmente de flores de uma mesma família, género ou espécie, e possui características sensoriais e físico-químicas próprias. É considerado monofloral de determinada espécie, quando o seu pólen tem uma representação superior a 45%. Esta regra geral apresenta, no entanto, várias exceções, pois existem plantas cujo pólen aparece supra-representado e outras em que aparece infra-representado, no espectro polínico. A percentagem a considerar é inferior a 45% para o caso das infra-representadas e superior a 45% para as supra-representadas, dependendo o valor a considerar de uma avaliação prévia da capacidade da planta para a produção de pólen.

1.5.1.2. Composição química

Os açúcares são os constituintes maioritários do mel e correspondem a cerca de 95 a 99% da matéria seca.¹⁸ A frutose ($\approx 38\%$), a glucose ($\approx 30\%$) e a sacarose ($\approx 1\%$),¹⁹ são os açúcares principais, observando-se ainda a presença de alguns dissacarídeos e trissacarídeos. Segundo a legislação Portuguesa, para que um mel seja classificado como mel de néctar, o teor mínimo de frutose e glucose é de 60 %, podendo a proporção de frutose e glucose depender bastante da fonte do néctar,¹⁹ oscilando, geralmente, a proporção de frutose/glucose entre 1 a 1,2.²⁰ Esta proporção pode influenciar as características organolépticas do mel devido à sensação mais adocicada da frutose, mas também à sua granulação, uma vez que a glucose é menos solúvel em água que a frutose. Assim, os méis com razões frutose/glucose superiores permanecem líquidos durante períodos maiores.^{20,21} O teor em sacarose surge também regulamentado com um valor máximo permitido de 5%, podendo existir exceções para alguns tipos de mel. Um elevado teor de sacarose aparente, pode significar uma adulteração do mel ou uma recolha prematura, uma vez que a sacarose ainda não foi totalmente dissociada em glucose e frutose pela ação da enzima invertase, segregada pelas abelhas e adicionada ao néctar durante o transporte para a colmeia.²³ A análise do conteúdo em açúcares no mel é

realizada através de cromatografia líquida ou gasosa ou alternativamente através de titulações colorimétricas.²³

A água é o segundo maior componente no mel. Também este parâmetro depende de vários fatores, como a época de colheita, o grau de maturação alcançado na colmeia e de fatores climatéricos.²¹ O teor em água tem elevada influência em algumas das propriedades físicas do mel, tais como a cristalização e a sua viscosidade. Adicionalmente, um mel com um conteúdo de água excessivo pode apresentar dificuldades na preservação e armazenamento,¹⁸ associado ao maior risco de fermentação e de cristalização.²² O teor de humidade do mel não deve exceder os 20%, com exceção do mel de urze que pode revelar valores até 23% de humidade.¹³ O conteúdo de água do mel é geralmente determinado por um método indireto baseado em sólidos solúveis por estimativa do conteúdo através do índice refratométrico (RI). Uma vez que a composição de sólidos do mel pode variar em diferentes méis, isso afeta a conversão de RI em teor de água. Assim, a determinação do teor de água em méis por refratometria não produz exatamente o “verdadeiro teor de água”, no entanto, é um método simples, rápido e reprodutível e por esta razão é utilizado com sucesso no controlo de rotina do mel.²⁴

De entre os vários constituintes menores do mel, os ácidos orgânicos contribuem significativamente para o sabor e podem ser indicadores de deterioração tendo em conta o armazenamento, o envelhecimento, ou mesmo para avaliar a pureza e autenticidade.²⁵ Os ácidos orgânicos como sejam o málico, ascórbico, fumárico ou o cítrico proveniente do néctar, o ácido glucónico resultante da ação da glucose oxidase ou os associados à ação de bactérias durante a maturação do mel²³ contribuem todos para os teores de acidez do mel, e variam de acordo com a origem floral. Internacionalmente, para a acidez livre os valores devem ser inferiores a 50 meqkg^{-1} .¹³

Em termos nutricionais, a composição mineral é muito importante para a avaliação do mel como suplemento alimentar e tem sido estudada por diferentes autores.²⁶ O teor em macrominerais, como o potássio, cálcio, e sódio, e minerais, como o ferro, cobre, zinco, manganês, desempenham um papel fundamental em sistemas biológicos. No mel, o teor em minerais varia entre 2 a 10%, com o potássio a representar o elemento mais abundante e responsável por um terço do total do conteúdo mineral. A presença de metais pesados, como chumbo, cádmio, mercúrio e alumínio, é também avaliada no mel por alguns autores, mas neste caso como indicativo da exposição a fontes de poluição.²⁷

O conteúdo de azoto no mel é reduzido sendo o valor médio cerca de 0,04%.²⁸ Os compostos azotados são essencialmente alcaloides, derivados da clorofila, aminoácidos e aminas²⁹ e enzimas nas quais se incluem a invertase, diastase, glucose oxidase, catalase, α -glucosidase, β -glucosidase e amilase.³⁰ Relativamente aos aminoácidos, a prolina é dominante mas também é possível encontrar arginina, triptofano e cisteína, cuja presença é característica em alguns tipos de mel. A análise do perfil de aminoácidos é mais adequada para a deteção da origem botânica e geográfica do mel do que a composição proteica.³⁰

Um dos constituintes minoritários do mel mais estudados são os compostos fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos e flavonóides, pela sua relevância na cor, nas características sensoriais e em diversas propriedades bioativas associadas ao mel. Adicionalmente, a especificidade de alguns ácidos fenólicos e flavonóides permite associar o mel com a sua origem floral, funcionando assim como marcadores para a origem botânica de alguns tipos de méis. Assim, por exemplo, a análise de flavonóides no mel de laranjeira apresenta a presença de um flavonóide característico, a hesperitina. Este composto pode funcionar como indicador da origem floral do mel de laranjeira. O ácido abscísico no mel de urze, campeferol no mel de alecrim e quercetina no mel de girassol são outros marcadores fenólicos do mel.³¹ A caracterização de compostos fenólicos em méis de diferentes tipos e origens baseia-se fortemente em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com deteção de díodos (DAD).³²

1.5.2. Propriedades bioativas do mel

O mel, à semelhança de muitos outros produtos naturais, pode apresentar uma grande variedade de compostos com atividade terapêutica, nomeadamente, polifenóis (ácidos fenólicos e flavonóides). Estes compostos são uma fonte de antioxidantes o que permite considerar o mel um alimento nutracêutico mas também potencia o seu uso a nível medicinal dada a sua atividade antimicrobiana. Por estas razões, o mel tem sido utilizado na medicina popular desde os tempos mais remotos da civilização humana e, recentemente, foi redescoberta a sua função no tratamento de queimaduras, doenças gastrointestinais, asma, feridas infetadas e úlceras cutâneas.³³

Um antioxidante é “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com a de um substrato oxidável, atrasa significativamente

ou inibe a oxidação do referido substrato". Esta definição inclui compostos de natureza não-enzimática, bem como de natureza enzimática.²⁶ No mel, os principais componentes responsáveis pela sua atividade antioxidante são os compostos fenólicos, tais como os ácidos fenólicos e os flavonóides, os quais dependem da origem floral, bem como de fatores sazonais e ambientais. Alguns destes compostos responsáveis pela atividade antioxidante estão identificados no mel, nomeadamente, os ácidos cinâmico, cafeico, ferúlico e cumárico, a quercetina, crisina ou o campferol.²⁷ De um modo geral os méis escuros apresentam uma maior diversidade em compostos fenólicos e conseqüentemente uma atividade antioxidante mais elevada.

Nos seres humanos, a investigação sobre o efeito terapêutico do mel é em grande parte focada nas propriedades antimicrobianas, associadas a vários fatores, onde se inclui a acidez, o teor em peróxido de hidrogénio, a osmolaridade e a presença de componentes fitoquímicos. Além de inibir o crescimento microbiano, alguns destes fatores podem também ter um papel a desempenhar no controlo da inflamação e promover o processo de cura por meio da modulação de citocinas, a proliferação de fibroblasto e a angiogénese.¹⁹ A relevância dos diferentes componentes do mel na sua atividade antimicrobiana é, no entanto, questionada por vários investigadores que atribuem ao peróxido de hidrogénio a responsabilidade pela ação antibacteriana do mel. Estes autores defendem que ácidos fenólicos como derivados dos ácidos benzóico e cinâmico podem contribuir para a atividade antibacteriana do mel, mas a contribuição desses componentes é pequena em comparação com a contribuição de peróxido de hidrogénio.³⁴

1.5.3. Controlo de qualidade

A seleção de métodos para o controlo de rotina da qualidade do mel tem sido efetuada para incluir todos os parâmetros que, no estado atual do conhecimento, são necessários para a determinação da qualidade do mel.²³ Estes parâmetros permitem aferir sobre as técnicas de produção e maneiio das colónias, sobre a presença ou ausência de adulterações do mel ou simplesmente sobre as diferentes características do mel associadas com a sua origem floral. A nível internacional, os parâmetros de qualidade estão definidos no codex alimentar¹³ e na diretiva Europeia do mel,³⁵ servindo de base ao comércio

internacional. Na Tabela 1 apresentam-se os limites para os diversos parâmetros e tipos de mel, de acordo com a legislação internacional.

Tabela 1- Legislação internacional para a qualidade do mel.

Parâmetro	Limites	Referências
Humidade (%)	<20	Codex alimentar ¹³
Exceção	<23 <i>Caluna</i>	
Teor de açúcares Frutose+ Glucose (%)	>60 mel de néctar	Diretiva Europeia ³⁵
	>45 mel de melada ou mistura de mel de melada com mel de néctar	
Teor de sacarose (%)	<5	Diretiva Europeia ³⁵
Exceções	<10 (<i>Robinia pseudoacacia; Medicago sativa; Banksia menziesii; Hedysarum; Eucalyptus camadulensis; Eucryphia lucida; Eucryphia milliganii; Citrus spp.</i>)	
	<15 (<i>Lavandula spp.; Borago officinalis</i>)	
Matéria insolúvel (%)	<0,1	Codex alimentar ¹³
Exceção	<0,5 méis prensados	
Condutividade mScm ⁻¹	<0,8	Codex alimentar ¹³
	>0,8 mel de melada e castanea	
Exceções	(<i>Arbutus unedo; Erica; Eucalyptus; Lima; Tilia spp.; Calluna vulgaris, Leptospermum; Melaleuca spp.</i>)	
Acidez livre meqkg ⁻¹	<50	Codex alimentar ¹³
HMF mgkg ⁻¹	<40	Diretiva Europeia ³⁵
Exceção	<80 méis de climas tropicais	
Diastase (DN)	>8 para mel determinado após o processamento e / ou mistura >3 no caso de méis com baixo teor de enzima natural	Codex alimentar ¹³
Prolina mgkg ⁻¹	>180	IHC ²³

1.6. Própolis

A própolis é um material viscoso elaborado pelas abelhas com o fim de selar as fissuras das colmeias mas também para controlar a contaminação biológica na colônia, Figura 3.³⁶ As abelhas preparam esta substância recolhendo com as suas mandíbulas os exsudatos resinosos de rebentos, folhas, flores, frutos, galhos e cascas de diferentes plantas presentes nas proximidades da colmeia, que uma vez introduzidas na colmeia são misturados com a cera e secreções salivares, a fim de produzir a própolis.^{37,38} Esta apresenta um cheiro agradável e uma cor que pode variar desde creme, amarela, verde, vermelha, castanho claro ou escura, dependendo muito da fonte da planta e da idade, Figura 3. Algumas amostras têm uma textura friável, dura, enquanto que outras amostras exibem uma textura elástica e pegajosa.



Figura 3- Própolis. (fontes: <http://beeinformed.org/2011/09/propolis-and-human-health/>; www.flickr.com).

A recolha da própolis é efetuada através da raspagem da resina colocada pelas abelhas sobre as paredes da colmeia ou através da colocação de redes específicas no interior da colmeia. Estas redes contêm orifícios que as abelhas irão selar com própolis que assim poderá ser recolhido pelo apicultor. As épocas de maior produção ocorrem na primavera e no outono.

1.6.1. Composição

A própolis é composta genericamente por 50% de resinas (compostos fenólicos) e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo resíduos orgânicos.³⁹ Mais de 300 compostos foram identificados até o momento em diferentes amostras de própolis.⁴⁰ Alguns dos compostos mais importantes que podem ser encontrados na própolis são os ésteres, ácidos aromáticos, ácidos gordos, hidratos de carbono, aldeídos, cetonas, ácidos aminados, chalconas, di-hidrochalconas, terpenóides, vitaminas e substâncias inorgânicas. A sua variabilidade química é muito elevada, e por esta razão é fundamental o estudo da composição da própolis obtida a partir de regiões diferentes.⁴¹ No caso das regiões de clima temperado, em que a principal fonte de resina se encontra nos rebentos de choupo (*Populus spp.*), a própolis apresenta uma composição rica em ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides e seus derivados metilados ou esterificados. Nas regiões tropicais, as abelhas procuram alternativas para a produção de resina noutras fontes florais, uma vez que os choupos não abundam neste tipo de clima. Em termos comerciais, a própolis verde, predominante no sudeste Brasileiro, é a mais importante, com uma composição rica em derivados prenilados de ácido fenilpropanóico, como a artepilina C e os ácidos cafeoilquínicos. Estas substâncias estão associadas aos rebentos de alecrim do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Outro dos tipos de própolis muito referido é a própolis vermelha recolhida pelas abelhas em Cuba, México e Brasil, a partir das espécies de jacarandá (*Dalbergia spp.*), que é caracterizada pela presença de isoflavonóides. A resina exsudada pelas flores de clusia (*Clusia spp.*) origina ainda outro tipo de própolis tropical em Cuba e na Venezuela, onde os constituintes maioritários são benzofenonas preniladas.⁴²

1.6.2. Propriedades bioativas da própolis

O interesse científico pela própolis tem crescido de uma forma exponencial encontrando-se descritos na literatura diversos exemplos da atividade da própolis como anti- hepatotóxico, antitumoral, antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, entre

outros, estas propriedades bioativas estão intimamente ligadas à composição química, em particular com a riqueza em compostos fenólicos,⁴³ que resulta de uma seleção das resinas recolhidas pelas abelhas fruto da sua evolução.

As atividades antibacteriana e antifúngica são as mais populares de entre as ações biológicas mais amplamente investigadas da própolis, considerando-se aos flavonóides, juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. O mecanismo de atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos.⁴⁴ Vários estudos evidenciaram que a própolis tem uma ação inibitória contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus* sp. e *Micobacterium* sp.), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* e *Klebsiella*), entre muitos outros,⁴⁵ sendo que as bactérias Gram-positivas mostram maior sensibilidade aos extratos da própolis.⁴⁶ A própolis evidencia também atividade fungicida em testes *in vitro* contra leveduras (não-dermatófitas) e fungos filamentosos (dermatófitos antropofílicos) reconhecidos como causadoras de onicomioses e contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.⁴⁵ Ao longo dos anos tem-se verificado uma atividade sinérgica da própolis com diversos antibióticos, tais como benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina, podendo assim ser uma alternativa terapêutica para combater microrganismos resistentes a drogas.⁴⁷

A capacidade antioxidante é outra componente bastante estudada na própolis e deve-se principalmente à presença de compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e álcoois, estilbenos, tocoferóis e tocotrienóis). Efetivamente, verifica-se uma correlação positiva entre a presença destes compostos e a atividade antioxidante. Esta atividade é importante por proteger os sistemas de defesa celulares contra os danos causados pelos radicais livres e outros agentes oxidantes que são os principais no mecanismo de ação de muitas toxinas. Estes radicais induzem danos oxidativos nas biomoléculas, tais como os lípidos, hidratos de carbono, proteínas, e ácidos nucleicos, podendo provocar morte celular.⁴⁵ A captação de radicais livres gerados por neutrófilos poderia ser um mecanismo antioxidante da própolis, que resulta numa atividade anti-inflamatória final.⁴⁸ Um ponto importante na pesquisa sobre a própolis incide nas suas propriedades anticancerígenas. A própolis e os seus compostos fenólicos têm demonstrado exercer um efeito protetor contra vários tipos de cancro, incluindo o cólon, pâncreas, pele, colo do útero, pulmão, entre

outros. Vários mecanismos contribuem para as propriedades de prevenção de cancro e antitumorais gerais da própolis e seus componentes fenólicos, incluindo a paragem do ciclo celular, a indução de apoptose e inibição da proliferação de células de cancro e crescimento tumoral.⁴⁹ O principal inconveniente observado nestes casos prende-se com a elevada toxicidade do extrato fenólico como um todo, apontando para a necessidade de avaliar alguns dos constituintes da própolis isoladamente.⁵⁰

Devido à complexidade química da própolis e sua dependência na flora e locais onde as colmeias estão presentes, a própolis é uma fonte de novos compostos e a cada dia novos estudos são relatados.³⁸

1.7. Objetivos

A apicultura é um setor da agricultura de fácil implementação, requer um baixo investimento e possibilita um retorno significativo quer ao nível económico quer ao nível alimentar, com um impacto positivo no equilíbrio ecológico. Em países subdesenvolvidos esta atividade agrícola, com a introdução de alguns conceitos tecnológicos, é uma ferramenta disponível para a promoção do desenvolvimento rural, social e para a melhoria das condições nutricionais das populações.

Este trabalho vem na sequência de um projeto de desenvolvimento rural EuropeAid/128139/L/ACT/GW “Valorização da Apicultura nas regiões de Bafatá e Gabú: produção, transformação e comercialização” que pretendeu implementar novas tecnologias na produção apícola como forma de melhorar a qualidade do mel produzido na região leste da Guiné-Bissau. No âmbito do projeto foram recolhidas nos anos de 2010 a 2013 diversas amostras de mel, inicialmente de locais pontuais onde se identificou produtores de mel, e posteriormente já no âmbito da estrutura de produção e extração de mel implementada junto dos apicultores locais. Adicionalmente foi considerada uma amostra de própolis da mesma região.

Com base nestas amostras, e considerando que não existe até ao momento qualquer registo sobre a qualidade dos produtos apícolas da Guiné- Bissau, o objetivo deste trabalho incidiu na avaliação da sua qualidade destes produtos apícolas.

Para a avaliação da qualidade do mel, foram efetuadas análises dos: (i) parâmetros físico-químicos como a condutividade elétrica, determinação do pH, acidez livre, lactónica e acidez total, teor em hidroximetilfurfural, humidade, índice diastásico, prolina, matéria insolúvel, açúcares por cromatografia líquida e cor; (ii) identificação floral do mel realizada através da análise polínica (trabalho efetuado em colaboração com o Laboratório de Apicultura e Sericicultura, da Universidade Aristóteles de Salónica, Grécia); e (iii) avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, através do estudo do teor em fenóis e da avaliação do efeito bloqueador de radicais livres e poder redutor das amostras.

A avaliação da qualidade da própolis incidiu sobre: (i) as propriedades físico-químicas da própolis em bruto, como o índice de cor por refletância, o teor em água, o teor em ceras e o teor em cinzas; e (ii) a análise da componente fenólica, nomeadamente o teor balsâmico, e a identificação dos teores em fenóis totais e flavonóides e (iii) avaliação da atividade antioxidante *in vitro* com a avaliação do efeito bloqueador de radicais livres e poder redutor.

Capítulo II

Material e Métodos

2.1. Amostragem

2.2. Análise do mel

2.3. Análise da própolis

2.4. Análise estatística



2. Material e Métodos

2.1. Amostragem

As amostras de mel e própolis foram recolhidas na região leste da Guiné- Bissau, país situado na Costa Ocidental de África, Figura 4, no âmbito do projeto “Valorização da apicultura nas regiões de Bafatá e Gabú: produção, transformação e comercialização” financiado pela União Europeia.

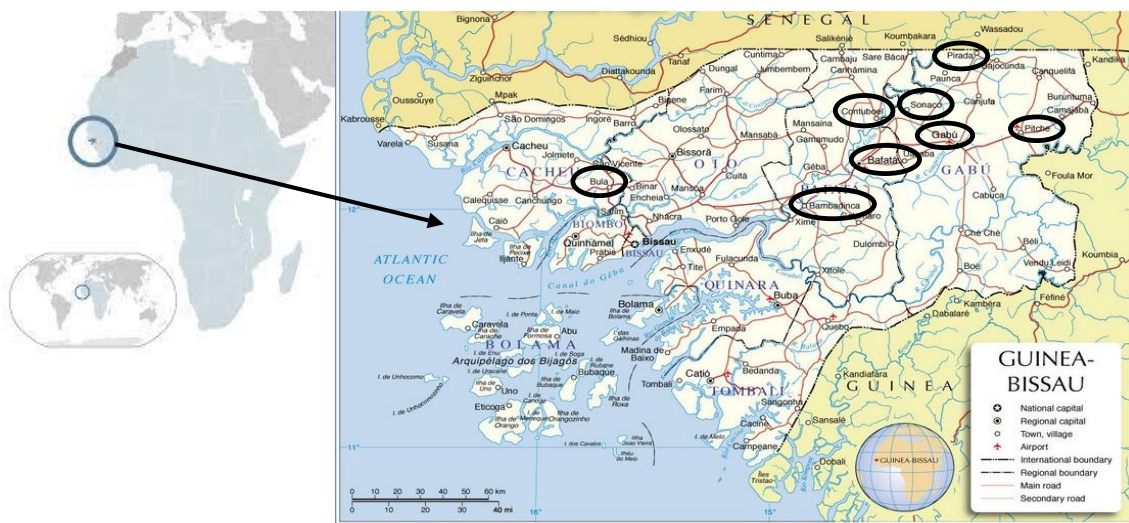


Figura 4- Origem geográfica das amostras de mel e própolis. (fontes:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Guinea-Bissau;>

[http://www.worldmapfinder.com/Map_Political.php?ID=/Pt/Africa/Guinea\).](http://www.worldmapfinder.com/Map_Political.php?ID=/Pt/Africa/Guinea).)

Os trabalhos incidiram na caracterização de onze amostras de mel recolhidas em oito regiões diferentes durante os anos de 2010 a 2013 e uma amostra de própolis, Tabela 2 e Figura 5. As amostras de mel de 2010 e 2011 foram produzidas pontualmente a partir de colmeias quenianas características nesta região de África e associadas a uma apicultura semi-moderna. Nestas amostras, o processo de extração de mel foi efetuado por centrifugação após corte dos favos. As amostras de 2012 foram produzidas em colmeias tradicionais e extraídas também por centrifugação, no entanto a recolha dos favos foi efetuada por processos tradicionais, implicando um processo prévio de prensagem dos favos durante o transporte do local da produção para a sala de extração. As amostras de

2013 foram já produzidas maioritariamente em colmeias quenianas seguidas de extração por centrifugação.

A amostra de própolis foi recolhida e separada por raspagem das paredes da colmeia. Todas as amostras de mel, após recebidas no laboratório, foram armazenadas a 4 °C, e a amostra de própolis a -20°C.

Tabela 2- Origem geográfica e ano de cresta das amostras.

Amostra	Origem geográfica	Ano cresta
	Bambadinca	2010
	Bula	2010
	Pirada	2012
	Sonaco	2012
	Contubel	2012
Mel	Pitche	2012
	Bafatá 02	2012
	Bafatá 03	2013
	Gabú 01	2011
	Gabú 02	2012
	Gabú 03	2013
Própolis	Bula	2010



Figura 5- Amostras em estudo: a) mel; b) própolis.

2.2. Análise do mel

A determinação dos parâmetros da qualidade do mel da Guiné-Bissau foi efetuada pela sua caracterização polínica, para identificação da origem floral, e pela avaliação dos parâmetros físico-químicos, de acordo com as metodologias definidas pela Comissão Internacional do mel, IHC.²³ Para além dos parâmetros físico-químicos, as amostras de mel foram avaliadas no teor em compostos fenólicos e na sua atividade antioxidante. Todos os parâmetros foram avaliados em triplicado.

2.2.1. Análise polínica

A análise polínica de mel, denominada de melissopalínologia, é um parâmetro de extrema importância para determinar e controlar a origem geográfica e botânica do mel, não se excluindo, por vezes, a necessidade de combinar os seus resultados com a análise sensorial e a avaliação dos parâmetros físico-químicos para um diagnóstico inequívoco da origem botânica.⁵¹ A realização da análise polínica foi efetuada por avaliação microscópica dos grãos de pólen e elementos de melada, com a colaboração do Laboratório de Apicultura e Sericicultura, da Escola Superior de Agricultura da Universidade Aristóteles de Salónica, Grécia. A metodologia utilizada na análise qualitativa e quantitativa seguiu os procedimentos descritos na literatura.^{51,52,53} Para a identificação dos pólenes foi considerada a informação disponível sobre a flora característica da Guiné-Bissau, classificando-se os méis de acordo com a densidade de elementos florais.^{54,55}

2.2.2. Cor

Para a análise colorimétrica as amostras de mel foram previamente aquecidas a 45°C de modo a assegurar a dissolução de quaisquer cristais de açúcar, medindo-se de seguida a cor através de um colorímetro C221 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA). Os méis foram classificados de acordo com a escala de Pfund, diretamente através da leitura no instrumento de medida.

2.2.3. Matéria insolúvel

A quantificação da matéria insolúvel é um parâmetro importante para detetar a presença de impurezas do mel, particularmente considerando as limitações de produção reconhecidas na Guiné-Bissau. Para a determinação deste parâmetro foi necessário um cadinho de porcelana com placa porosa, Filter-Tiegel 30 mL, por.4, 30 mm ϕ , previamente seco. Para garantir esta condição colocou-se um cadinho no forno durante uma noite, deixando-se arrefecer até à temperatura ambiente num exsiccador contendo sílica gel. Após o arrefecimento pesou-se o cadinho e utilizou-se na filtração de uma solução de mel. Esta solução foi preparada por pesagem de aproximadamente 5 g de mel da amostra dissolvida em 50 mL de água desionizada a 80°C. Após a passagem da solução pelo cadinho lavou-se cuidadosamente e abundantemente com água quente para remover todos os açúcares. Para comprovar a ausência de açúcares colocou-se um pouco do filtrado num tubo de ensaio com cerca de 1% de floroglucinol em etanol. A presença de açúcares é confirmada se se verificar a presença de cor na interface da solução, após a adição de algumas gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) pelas paredes do tubo.

Após confirmada a ausência de açúcares, secou-se o cadinho a 135°C durante uma hora, arrefecendo-se posteriormente no exsiccador até peso constante. O cálculo da matéria insolúvel, Equação 1, é expresso em percentagem de matéria insolúvel por 100 g de mel, não devendo ultrapassar 0,1% de acordo com a literatura.¹³

$$\% \text{Matéria insolúvel mg/100g} = (m/m_1) * 100 \quad (\text{equação 1})$$

m = massa de matéria seca; **m₁** = massa inicial de mel

2.2.4. Humidade

O teor em humidade foi medido diretamente por refratometria. Os resultados vêm expressos em percentagem.

2.2.5. Condutividade

A condutividade é um bom critério de avaliação da origem botânica do mel e, portanto, é usado muitas vezes no controlo de rotina do mel. Para a avaliação da condutividade foi necessário preparar uma solução de mel, diluindo-se 20 g de mel anidro em 100 mL de água destilada, medindo-se de seguida a condutividade elétrica com a ajuda de um medidor de condutividade Consort C868, previamente calibrado. Os resultados são expressos em mScm^{-1} . Para os méis de néctar o valor da condutividade não deverá ultrapassar os $0,8 \text{ mScm}^{-1}$ enquanto para os méis de melada e mel de castanheiro o valor da condutividade deve ser superior a $0,8 \text{ mScm}^{-1}$.²³

2.2.6. pH, acidez livre e acidez lactónica

A avaliação das propriedades ácidas do mel foi realizada por três parâmetros distintos, nomeadamente, através do valor do pH da solução inicial de mel, bem como utilizando um procedimento de titulação para o cálculo da acidez livre e acidez lactónica. Para a identificação da acidez livre efetuou-se simultaneamente dois procedimentos, um com a titulação no ponto de equivalência ($\text{pH}=7$), e outro a pH fixo de 8,3, ambos referenciados pela Comissão Internacional do mel.²³ Inicialmente foi preparada uma solução dissolvendo 5 g de mel em 50 mL de água desionizada. De seguida pipetou-se 25 mL desta solução para um matraz onde se colocou o eletrodo de pH, registando o valor inicial, e procedendo-se de seguida à titulação da solução com hidróxido de sódio (NaOH) $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, determinando o volume de base gasto para atingir o ponto de equivalência ($\text{pH}=7$) e posteriormente o ponto fixo ($\text{pH}=8,3$). Os valores obtidos permitem determinar a acidez livre.

Para a determinação da acidez lactónica, após atingir o ponto de equivalência, completou-se a adição de base até atingir o volume final de 10 mL, efetuando-se de seguida uma retrotitulação da base em excesso com ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ até atingir novamente o ponto de equivalência ($\text{pH}=7$). A diferença de NaOH gasto nas duas titulações permite calcular a acidez lactónica e a acidez total (livre + lactónica). Os resultados são expressos em meq kg^{-1} mel. De acordo com a literatura a acidez do mel não pode ser superior a 50 miliequivalentes de ácido por quilo de mel.¹³ A

titulação foi realizada com um medidor de pH (Hanna instruments, pH 211 microprocessador pH meter).

2.2.7. Hidroximetilfurfural

O conteúdo em hidroximetilfurfural (HMF), Figura 6, é utilizado frequentemente para avaliar as condições de armazenamento e temperatura a que o mel foi sujeito e está muito associado com o seu grau de fermentação. A análise do teor em HMF foi realizada por espectrofotometria. Para preparar a solução dissolveram-se 5 g de mel em 25 mL de água destilada e transferindo-se para um balão volumétrico de 50 mL, ao qual se adicionou 0,5 mL de solução Carrez I e 0,5 mL de solução Carrez II, perfazendo o volume total com água destilada. De seguida filtrou-se a solução, desprezando os primeiros 10 mL de filtrado, e recolheram-se duas alíquotas de 5 mL para dois tubos de ensaio. A um dos tubos adicionou-se 5 mL de água destilada (amostra) e ao outro 5 mL de uma solução de bissulfito de sódio (NaHSO_3) 0,2% (branco), lendo-se a absorvância a 284 e 336 nm num espectrofotómetro (Specord 200 spectrophotometer, Analytikjena, Jena, Alemanha). O teor de hidroximetilfurfural no mel após o processamento e/ou mistura não deve ser superior a 40 mgkg^{-1} . No entanto, no caso do mel de origem declarada de países ou regiões com temperaturas tropicais, e misturas desses méis, o teor de HMF poderá ser superior até um máximo de 80 mgkg^{-1} .³⁵ O valor de HMF é expresso em mgkg^{-1} e determinado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{HMF} = (\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336}) \times 149,7 \times (5/\text{massa amostra}) \quad (\text{Equação 2})$$

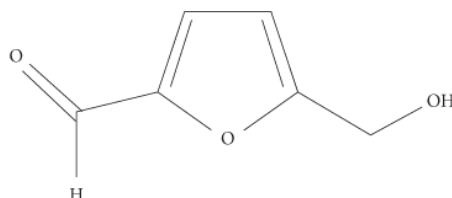


Figura 6- Estrutura química do hidroximetilfurfural

2.2.8. Índice diastásico

A avaliação da atividade diastásica é um dos critérios utilizado para identificar a frescura do mel devido à sua elevada sensibilidade ao calor e conseqüentemente à redução da quantidade desta enzima com o envelhecimento. Neste trabalho a sua determinação foi efetuada pelo método Phadebas.²³ Este é também um método espectrofotométrico realizado através da preparação de uma solução aquosa de mel obtida pela diluição de 1 g de mel num balão volumétrico de 100 mL. Após a preparação da solução, transferiu-se 5 mL para um tubo de ensaio e colocou-se num banho a 40°C, juntamente com um segundo tubo (branco) contendo os mesmos 5 mL mas de uma solução tampão acetato 0,1 moldm⁻³ (pH 5,2). De seguida colocaram-se as pastilhas Phadebas nos dois tubos, que após agitação se mantém a 40°C por 15 minutos adicionais durante os quais decorre a reação. Após este tempo adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 moldm⁻³, filtrou-se e registou-se a absorvância a 620 nm num espectrofotómetro (Specord 200 spectrophotometer, Analytikjena, Jena, Alemanha). O resultado é apresentado como índice diastásico (DN) em unidades Schade, correspondendo uma unidade de diastase à atividade enzimática de 1 g de mel capaz de hidrolisar numa hora 0,01 g de amido a 40°C. De acordo com a literatura¹³ para o mel, os valores deverão ser superiores a 8, exceto em alguns méis com baixo conteúdo enzimático, onde o valor pode baixar até 3 unidades, dependendo dos valores de HMF.

2.2.9. Prolina

A quantidade de prolina é também um indicador de frescura do mel e da potencial presença de adulterações. A sua avaliação foi realizada por métodos espectrofotométricos utilizando uma solução aquosa de mel obtida por diluição de 5 g de mel num balão volumétrico de 100 mL. Para a análise colocou-se 0,5 mL da solução de mel num tubo de ensaio (amostra), 0,5 mL de água num segundo tubo (branco) e 0,5 mL de solução padrão de prolina (0,032 mgmL⁻¹), em triplicado, noutros tubos (padrão), juntamente com idêntico volume de água. A cada um dos 5 tubos adicionou-se de seguida 1 mL de ácido fórmico (98%) e 1 mL de solução de ninhidrina (3%) e agitando-se vigorosamente durante 15 minutos. Após este tempo os tubos foram colocados num banho de água a ferver durante 15 minutos, e posteriormente num banho a 70°C durante

10 minutos adicionais. No final adicionou-se 5 mL de propan-2-ol a cada tubo de ensaio e deixou-se arrefecer com os tubos fechados, medindo-se, 45 minutos após remover do banho, a absorvância a 510 nm num espectrofotómetro (Specord 200 spectrophotometer, Analytikjena, Jena, Alemanha). O teor de prolina de mel é muito variável dependendo das suas características, no entanto, há países como a Alemanha, onde um mel com teor de prolina inferior a 180 mgkg⁻¹ é considerado não maduro ou adulterado.²³ Para o cálculo do teor em prolina, expresso em mgkg⁻¹, utilizou-se a equação seguinte, Equação 3, onde a absorvância do padrão foi calculada pela média dos três ensaios:

$$\text{Prolina} = (\text{Abs amostra}/\text{Abs padrão}) \times (\text{massa padrão}/\text{massa amostra}) \times 80. \quad (\text{Equação 3})$$

2.2.10. Açúcares

Neste trabalho, a quantificação dos teores em açúcar foi realizada por cromatografia líquida acoplada e um detetor de índice de refração (HPLC-RI) utilizando-se uma reta de calibração com padrões externos. Para a análise foi preparada uma solução por diluição de 2,5 g de mel e dissolveu-se em 20 mL de água desionizada, de seguida pipetou-se 11,5 mL de metanol e transferiu-se a solução de mel para um balão volumétrico de 50 mL, perfazendo o total do volume com água desionizada. A amostra foi depois filtrada em filtros de nylon de 0.2 µm antes de se injetar no cromatógrafo. O sistema de cromatografia utilizado foi constituído por uma bomba (Knauer, sistema Smartline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer Smartline 2300). A análise de dados foi realizada com o software Clarity 2.4 (DataApex). Para a separação cromatográfica foi usada uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30°C (forno Grace 7971 R). Como fase móvel utilizou-se uma mistura de acetonitrilo/água 80:20 (v/v), com um caudal de 1,3 mLmin⁻¹. A identificação dos açúcares foi obtida por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões, nomeadamente, frutose, glucose, sacarose, turanose, maltulose, maltose, trealose, melezitose e rafinose. Para cada um destes padrões foi estabelecida uma reta de calibração pelo método de padrões externos, utilizando-se uma gama de concentrações de acordo

com os níveis esperados para cada açúcar, Tabela 3. Os valores para as amostras foram calculados a partir da área dos picos e são apresentados em g/100 g de mel.

Para os méis com origem no néctar das flores, a legislação³⁵ obriga a que o teor de frutose e glucose seja superior a 60%, enquanto para os méis de melada esse valor poderá atingir um mínimo de 45%. Para a sacarose, utilizada como um indicativo de adulteração ou alimentação artificial das abelhas, o valor máximo admissível na generalidade dos méis é de 5%. A análise do perfil de açúcares foi também considerada em termos de relação frutose+glucose, frutose/glucose e glucose/água, com o objetivo de aferir da tendência à cristalização dos méis.

Tabela 3- Intervalo de concentrações referente a cada um dos padrões e respetivas retas de calibração, e coeficientes de correlação.

Açúcares padrão	Intervalo de concentrações (mgmL ⁻¹)	Reta de calibração	R ²
Frutose	3,8 - 60,1	Y=58,304x+34,463	0,9990
Glucose	2,8 - 45,1	Y= 54,919x+11,452	0,9993
Sacarose	0,9 - 15,1	Y=59,283x-7,8996	0,9998
Turanose	0,3 - 4,5	Y=47,235x-3,5182	0,9992
Maltulose	0,3 - 4,6	Y=43,371x-7,1869	0,9994
Maltose	0,3 - 4,7	Y=28,911x-1,6	0,9995
Trealose	0,3 - 4,8	Y=53,532x-6,8796	0,9995
Melezitose	0,3 - 4,9	Y=47, 666x+5,496	0,9956
Rafinose	0,3 - 4,10	Y=41,905x-0,2969	0,9997

2.2.11. Conteúdo fenólico - Fenóis totais

Para a determinação do teor em fenóis totais foi aplicado o método de Folin-Ciocalteu, descrito na literatura,⁵⁶ com algumas modificações. Inicialmente foi preparada uma solução pesando 1 g de mel em 10 mL de metanol (MeOH). De seguida, a uma alíquota (0,5 mL) desta solução foi adicionado 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e, após 3 minutos, 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (10% w/v),

ajustando-se o volume final para 5 mL com água desionizada. A solução final foi mantida no escuro e à temperatura ambiente durante 1 hora medindo-se a absorvância a 700 nm, num espectrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento usando 0,5 mL de MeOH em detrimento da amostra. O ácido gálico (GA) foi utilizado como padrão numa gama de concentrações entre 0,005-0,15 mgmL⁻¹, obtendo-se a seguinte curva de calibração ($y=8,0586x+0,0027$; $R^2=0,992$). Os resultados finais do conteúdo em fenóis totais são expressos em mgGAEg⁻¹ de mel, onde GAE representa unidades equivalentes em ácido gálico.

2.2.12. Atividade antioxidante

2.2.12.1. Efeito bloqueador de radicais livres

O uso do ensaio do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) é um método usado regularmente para avaliar a capacidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres. O DPPH é um radical livre estável, capaz de aceitar um eletrão ou um átomo de hidrogénio, tornando-se num não radical dificilmente oxidável, Figura 7.⁵⁷ Devido a este eletrão desemparelhado, o DPPH apresenta uma forte absorvância a 515 nm. Se o eletrão emparelhar, essa absorvância diminui à medida que a reação entre as moléculas antioxidantes e os radicais de DPPH ocorre. Assim, quanto mais decresce a absorvância, maior será a atividade antioxidante do extrato sob estudo.⁵⁸

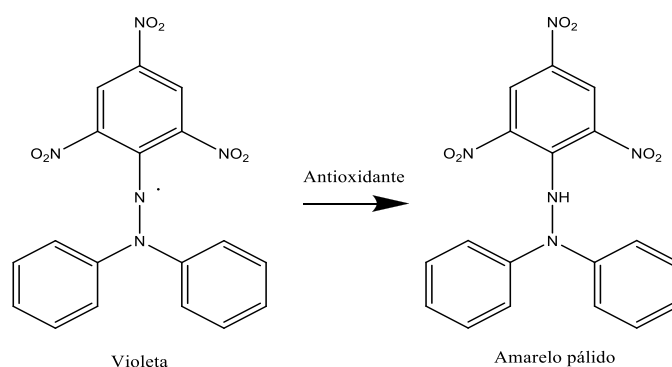


Figura 7- Redução do DPPH.⁵⁷

A capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH foi avaliada de acordo com a metodologia descrita na literatura, com algumas modificações.⁵⁹ Para tal, numa placa de 96 poços, misturou-se 10 µL de uma solução metanólica da amostra, com

diferentes concentrações (0,003 a 0,03 mgmL⁻¹) com 0,15 mL de uma solução metanólica contendo os radicais de DPPH (0,060 mmoldm⁻³), onde repousou durante 60 minutos no escuro, à temperatura ambiente. A redução da concentração do radical de DPPH foi medida pela monitorização do decréscimo da absorvância a 515 nm num leitor de microplacas (ELX800 Microplate Reader Bio-Tek Instruments, Inc.). O efeito bloqueador de radicais de DPPH foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(A_{\text{DPPH}} - A_A) / A_{\text{DPPH}}] \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

em que A_A corresponde à absorvância da solução com extrato da amostra e A_{DPPH} à absorvância inicial da solução de DPPH. Os resultados foram expressos através do valor EC₅₀, correspondendo à concentração de extrato que bloqueia 50% dos radicais de DPPH presentes na solução inicial.⁴² Para comparação foi usada uma solução padrão de ácido gálico cujo valor médio de EC₅₀ é de 1,22 mgmL⁻¹.

2.2.12.2. Poder redutor

A presença de agentes redutores em extratos naturais pode ser utilizada como uma outra metodologia de caracterização da capacidade antioxidante de uma amostra, nomeadamente através da redução do complexo Fe³⁺, ferrocianeto à sua forma ferrosa, Fe²⁺, provocando a formação de uma coloração azul da prússia, avaliada a 700 nm. A passagem da cor amarela da solução em ensaio para tons de verde e azul, monitoriza a formação de iões Fe²⁺, dependendo a concentração do complexo formado do poder redutor de cada extrato. A química deste processo de redução pode ser resumida pelas seguintes equações, Figura 8:

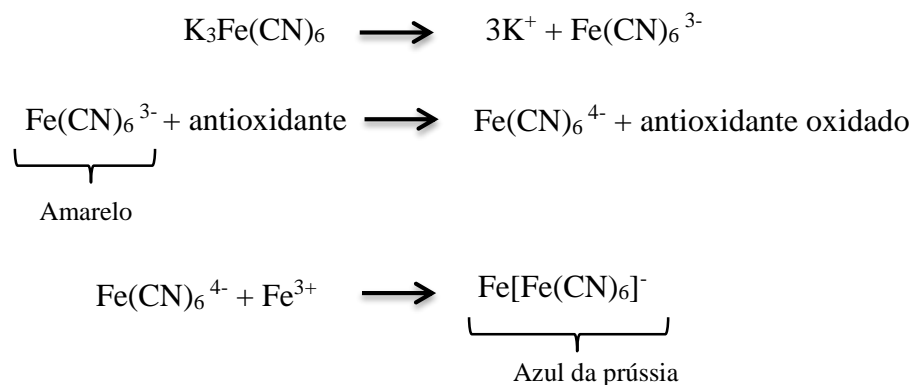


Figura 8- Equações da redução do complexo Fe³⁺/ferrocianeto à sua forma ferrosa.⁶⁰

Para avaliar o poder redutor aplicou-se a metodologia descrita na literatura,⁵⁹ com algumas modificações. Assim, misturou-se 15 µL de uma solução de mel com uma concentração de 0,005 g mL⁻¹ com 1,25 mL de uma solução de tampão fosfato de sódio com pH 6,6 e com 1,25 mL de ferrocianeto de potássio (0,2 mol dm⁻³). Após a adição, a mistura foi agitada vigorosamente e incubada a 50 °C durante 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 1,25 mL de ácido tricloroacético (a 10%) seguindo-se um processo de centrifugação a 1000 rpm, durante 8 minutos (Centorion K24OR-2003 refrigerated centrifuge). No final retirou-se 1,25 mL do sobrenadante, e adicionou-se 1,25 mL de água destilada e 0,25 mL de cloreto férrico a 0,1%, medindo-se de seguida a absorvância a 700 nm num espectrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Como padrão foi utilizada uma solução de ácido gálico num intervalo de concentrações de 0,001 a 0,01 mg mL⁻¹ ($y=46,415x-0,0275$; $R^2=0,993$). Os resultados do poder redutor das amostras de mel é expresso em mgGAEg⁻¹ de mel, onde GAE representa unidades equivalentes em ácido gálico.

2.3. Análise da própolis

Para a análise da própolis foram realizados alguns ensaios de características físico-químicas da amostra em bruto, como o índice de cor, o teor em água, cinzas e ceras. Adicionalmente foi efetuada a quantificação dos compostos fenólicos por métodos espectroscópicos e a avaliação da atividade antioxidante. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

2.3.1. Índice de cor

A cor da própolis em bruto foi determinada por meio de um colorímetro Minolta Chroma meter CR-400 (Osaka, Japão) e registada no sistema L*a*b* de cor. Este sistema, CIELAB, consiste numa componente de luminosidade (L*) e duas componentes cromáticas, onde o valor a* representa a variação de verde (-a) para vermelho (+a) e o valor b* representa a variação de azul (-b) para amarelo (+b). Os valores da cor (C*ab) obtidos a partir dos parâmetros a* e b* também foram determinados pelo instrumento. O colorímetro foi calibrado com uma placa branca padrão (L*=50,11; a*=11,96; b*=18,11; C*ab =21,7), utilizando como referências nas medidas o iluminante C e CIE 1931 e o

observador a 2°. Para a análise, a amostra foi homogeneizada e colocada sob um fundo branco.³⁹

2.3.2. Teor de água

O teor de água foi determinado por secagem de uma amostra de 2 g de própolis em bruto durante 2 horas, até peso constante, num forno convencional a 105 °C.³⁹

2.3.3. Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração da amostra de 0,5 g de própolis em bruto, a 600 ± 15 °C, com base nos procedimentos AOAC.⁶¹

2.3.4. Teor de cera

O conteúdo de cera foi determinado de acordo com o método descrito por Woiksi e Salatino,^{62,63} com algumas modificações. A amostra de própolis bruto (500 mg) foi tratada com n-hexano num sistema de Soxhlet, durante 3 horas. O extrato de n-hexano foi em seguida evaporado sob pressão reduzida, adicionando-se depois ao resíduo seco, previamente pesado, 20 mL de etanol a quente. A mistura foi fervida e filtrada através de papel de filtro Whatman nº 41, para um balão previamente pesado. Após a filtração, arrefeceu-se o balão até 0 °C e pesou-se, efetuando-se uma nova filtração da amostra através de papel de filtro Whatman nº 41. Depois da secagem o balão (com algum resíduo sólido) foi pesado, assim como o resíduo retido no papel de filtro. O teor de cera calculado pela soma da massa final no papel de filtro e das ceras retidas no balão, é expresso em percentagem em massa.⁶⁴

2.3.5. Conteúdo fenólico

2.3.5.1. Extração

A própolis é uma matriz rica em compostos fenólicos, responsáveis pela sua elevada atividade biológica. O processo de extração dos compostos fenólicos da própolis é altamente dependente das condições experimentais, tais como a temperatura ou

polaridade do solvente. O procedimento aplicado neste estudo decorreu de acordo com o descrito em trabalhos anteriores.³⁹ Previamente à extração, a amostra foi limpa de detritos, homogeneizada e, em seguida, misturada com 80% de etanol/água numa proporção de 1:10 (m/v), colocando-se a 70 ° C durante 1 hora, sob agitação. A mistura resultante foi filtrada e o resíduo foi re-extraído sob as mesmas condições. Após a segunda extração, as soluções filtradas foram combinadas, concentradas, congeladas a -20 ° C e liofilizadas.³⁹ O resultado é expresso em percentagem em massa e representam o teor balsâmico da própolis.

2.3.5.2. Fenóis totais

O teor em fenóis totais foi determinado por uma modificação do método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton.⁶⁵ Uma alíquota (0,5 mL) de extrato etanólico³⁹ (0,05 mgmL⁻¹) foi adicionado a 0,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, adicionou-se 1 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) e ajustou-se o volume final para 5 mL com água desionizada. A solução foi depois aquecida a 70 ° C durante 10 minutos, recolhendo-se em seguida para o escuro durante 30 minutos. No final foi medida a absorvância a 760 nm num espectrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Para o branco utilizou-se o mesmo procedimento substituindo apenas a alíquota de extrato etanólico de própolis por etanol. Os resultados finais são expressos em g/100g de própolis, utilizando-se como padrão uma mistura representativa da própolis, constituída por ácido cafeico: galangina: pinocembrina (1:1:1), ($y=4,7439x+0,0737$; $R^2=0,99$) num intervalo de concentrações de 0,010 a 3,14 mgmL⁻¹.³⁹

2.3.5.3. Flavonas e flavonóis

O conteúdo em flavonas e flavonóis nos extratos foi determinado espectrofotometricamente seguindo o método de Cvec et al.⁶⁶ A uma alíquota (2 mL) de extrato etanólico de própolis (0,1 mgmL⁻¹) foi adicionado 0,2 mL de uma solução de cloreto de alumínio (2% de cloreto de alumínio e 5% de ácido acético glacial em metanol) e 2,8 mL de uma solução de 5% de ácido acético glacial em metanol. A solução final aguardou 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente. De seguida foi medida a absorvância a 415 nm num espectrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento mas sem a adição de cloreto de

alumínio. Como padrão, para o traçado da curva de calibração ($y=18,144x+0,0112$; $R^2=0,995$), foi utilizada uma solução de galangina, num intervalo de concentrações de 0,0025 a 0,05 mgmL⁻¹. O resultado é expresso em g/100g de própolis.

2.3.5.4. Flavanonas e di-hidroflavonóis

As flavanonas e di-hidroflavonóis foram determinadas segundo o método descrito por Popova et al.,⁶⁷ com modificações. A uma alíquota (0,5 mL) de extrato etanólico (0,5 mgmL⁻¹) foi adicionado 1 mL de uma solução de 2,4- dinitrofenil-hidrazina (0,5 g de DNP em 1 mL de ácido sulfúrico a 96 %, perfazendo com metanol para um volume final de 50 mL) e 1 mL de metanol. Esta solução foi depois aquecida num banho a 50 °C durante 50 minutos, com agitação. Após este tempo colocou-se a solução no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos e adicionou-se 3,5 mL de uma solução de hidróxido de potássio (10% em 70% de metanol/água). De seguida retirou-se 0,5 mL da solução para um novo tubo onde se adicionou 24,5 mL de metanol, para perfazer um volume final de 25 mL. A avaliação da intensidade do complexo formado foi medida a 486 nm no espectrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Para a determinação do branco foi preparada uma solução segundo os mesmos procedimentos, excluindo a adição da amostra. Os resultados são expressos em g/100g de própolis, efetuando-se uma curva de calibração com o padrão pinocembrina ($y=0,1169x+0,0176$; $R^2=0,998$) num intervalo de concentrações de 0,18 a 6 mgmL⁻¹.

2.3.6. Atividade antioxidante

2.3.6.1. Efeito bloqueador de radicais livres

A capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH foi aplicada segundo com o descrito na literatura, por Brand-Williams et al.,⁵⁷ com ligeiras modificações. Para tal, numa placa de 96 poços, misturou-se 8 µL de extrato etanólico da amostra, com diferentes concentrações (0,0025-0,04 mgmL⁻¹) com 0,15 mL de uma solução etanólica a 80%, contendo os radicais de DPPH (0,060 mmoldm⁻³), onde repousou durante 45 minutos no escuro, à temperatura ambiente. A redução da concentração do radical de DPPH foi medida pela monitorização do decréscimo da absorvância a 515 nm num leitor de microplacas (ELX800 Microplate Reader Bio-Tek Instruments, Inc.). O efeito

bloqueador do DPPH foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, usando a Equação 4.

O resultado é expresso através do valor EC_{50} , correspondendo à concentração de extrato que bloqueia 50% dos radicais de DPPH presentes na solução inicial. Para comparação foi usada uma solução padrão de compostos fenólicos de ácido cafeico: galangina: pinocembrina, (1:1:1),⁴² em que o valor médio de EC_{50} calculado foi de 0,15 $mgmL^{-1}$.

2.3.6.2. Poder redutor

A metodologia aplicada para avaliar o poder redutor na amostra de própolis foi efetuada de acordo com o procedimento descrito por Oyaizu,⁶⁸ com algumas modificações. A 1 mL do extrato da amostra (com diferentes concentrações 0,03-0,3 $mgmL^{-1}$) adicionou-se 1,25 mL de uma solução de tampão fosfato de sódio com pH 6,6 e 1,25 mL de ferrocianeto de potássio (0,2 $mol\ dm^{-3}$). Após a adição, a mistura foi agitada vigorosamente e posteriormente incubada a 50 °C durante 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 1,25 mL de ácido tricloroacético a 10% seguindo-se um processo de centrifugação a 3000 rpm, durante 8 minutos (Centorion K24OR-2003 refrigerated centrifuge). No final retirou-se 1,25 mL do sobrenadante, e adicionou-se 1,25 mL de água destilada e 0,25 mL de cloreto férrico a 0,1%, medindo-se de seguida a absorvância a 700 nm num espectrofotómetro (Analytik Jena, Jena, Alemanha). Os resultados do poder redutor na amostra de própolis é expresso em g por 100 g de mel. Como padrão foi utilizado uma mistura de ácido cafeico: galangina: pinocembrina (1:1:1), ($y=3,5486x+0,09$; $R^2=0,9911$) num intervalo de concentrações de 0,034 a 0,280 $mgmL^{-1}$.

2.4. Análise estatística

Todas as experiências foram realizadas em triplicado. Os resultados são expressos como valores médios e desvios padrão. As diferenças entre as diferentes amostras foram analisadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguido da diferença significativa do teste de Tukey post hoc com $\alpha = 0,05$. Este tratamento foi realizado utilizando o programa SPSS v. 18.0.

Capítulo III

Resultados e Discussão

3.1. Análise do mel

3.2. Análise da própolis



3. Resultados e Discussão

Neste capítulo descreve-se a avaliação dos parâmetros de qualidade dos produtos apícolas da Guiné-Bissau, mel e própolis, oriundos da região norte e leste. A sua caracterização é um fator fundamental para a valorização e comercialização destes produtos nos mercados internacionais. Esta é a primeira caracterização realizada aos produtos da colmeia da Guiné-Bissau.

3.1. Mel

A caracterização das amostras foi efetuada através do conteúdo polínico do mel, pela avaliação dos parâmetros físico-químicos, assim como pela sua atividade antioxidante. Os parâmetros físico-químicos incidiram sobre a cor, matéria insolúvel em água, humidade, condutividade, acidez, hidroximetilfurfural, diastase, prolina e açúcares redutores. Para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foi identificado o conteúdo em fenóis totais e avaliada a sua atividade bloqueadora de radicais livres (DPPH), bem como o poder redutor.

3.1.1. Análise polínica

O mel inclui na sua composição numerosos grãos de pólen maioritariamente das espécies de plantas nectaríferas visitadas pelas abelhas, bem como elementos de melada (fragmentos de plantas, algas e esporos de fungos) que em conjunto fornecem uma identificação do ambiente em redor da colmeia de onde o mel provém. A análise polínica é assim importante para determinar a origem geográfica e botânica do mel, fornecendo adicionalmente algumas informações relevantes sobre o processo de extração de mel, filtração, fermentação e aspetos de higiene, como a contaminação com poeira mineral, fuligem, ou grãos de amido.⁶⁹

A análise polínica é efetuada pela identificação da estrutura dos grãos de pólen observados por microscopia. Neste caso particular, a análise é particularmente difícil pela escassez de informação científica anterior sobre a caracterização botânica da região em estudo e a sua relevância para as abelhas. Por esta razão, a identificação polínica foi realizada em colaboração com o Laboratório de Apicultura e Sericultura da Universidade

de Tessalónica, Grécia. A análise quantitativa de elementos de plantas, pólen e elementos de melada, encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4- Classificação dos méis de acordo com a quantificação dos elementos de plantas (pólen e elementos de melada (HDE)).⁵¹

Amostra	Pólen P/10 g mel	HDE/P	Classe
Bambadinca	127011	0,26	III
Bula	43159	0,48	II
Pirada	1577612	0,03	V
Sonaco	2373311	0,03	V
Contubel	1874344	0,02	V
Pitche	3173231	0,03	V
Bafatá 02	1894896	0,06	V
Bafatá 03	186201	0,17	III
Gabú 01	155373	0,23	III
Gabú 02	1970527	0,04	V
Gabú 03	616561	0,03	IV

Os resultados evidenciam a presença de um elevado conteúdo de elementos de plantas, classificando-se a maioria das amostras na classe V, atribuída a méis prensados. Efetivamente, a utilização de técnicas artesanais e semi-artesanais na extração de mel da Guiné envolve a aplicação parcial de prensagem dos favos, muitos dos quais contêm também uma quantidade significativa de pólen. Este procedimento conduz à introdução de pólen no mel em número muito superior ao expectável quando se compara com o mel centrifugado. A classificação dos méis de Bambadinca, Bula, Bafatá 03 e Gabú 01, recai já em classes associadas com méis florais, e a redução da quantidade de pólen resulta nestes casos da aplicação de um processo de produção centrado em colmeias quenianas (semi-tradicionais) e extração por centrifugação. A redução polínica verificada nas amostras de Bafatá evidencia a vantagem em termos qualitativos da implementação e evolução de procedimentos de extração aplicados pelos produtores de mel nessa região.

A identificação de méis de melada é caracterizada pela presença de diversos elementos de plantas para além do pólen, particularmente hifas e esporos de bolor, algas unicelulares e fragmentos de plantas, classificados no seu conjunto como elementos de melada, HDE. Para a classificação do mel como mel de melada é necessário que a relação entre a quantidade de elementos de melada e o pólen de plantas nectaríferas seja superior a 3.⁷⁰ Como se pode observar na Tabela 4, o valor mais alto de 0,5 foi encontrado para o mel de Bula, o que nos indica que todas as amostras podem ser classificadas como méis de néctar.

Em termos qualitativos, a análise microscópica do pólen permitiu identificar a presença de 32 diferentes tipos de pólen, Tabela 12, Anexos, dos quais os mais representativos se encontram descritos na Tabela 5. A presença de *Terminalia macroptera* (macete) e *Rhizophora spp.* (tarafe) é identificada em praticamente todos os méis, em quantidades que chegam a atingir mais de 40%. A *Rhizophora spp.*, Figura 9, é uma planta muito característica das zonas ribeirinhas, comum em toda a Guiné-Bissau, pelo que a sua presença não surpreende. Em oposição, verifica-se que o cajueiro (*Anacardium occidentale*) uma das árvores que ocupa quase 70 % da área arável da Guiné-Bissau, surge apenas numa das amostras, o que revela a sua fraca aptidão para as abelhas. A mesma situação é verificada com a mangueira (*Mangífera indica*) que apesar da sua distribuição em quase todas as aldeias, surge apenas em quantidade baixa em duas das amostras. Para além dos referidos encontra-se ainda bem representados o lírio (*Crinum spp.*), a canafístira (*Cassia siberiana*) e a palmeira (*Elaeis guineenses*), entre outros.

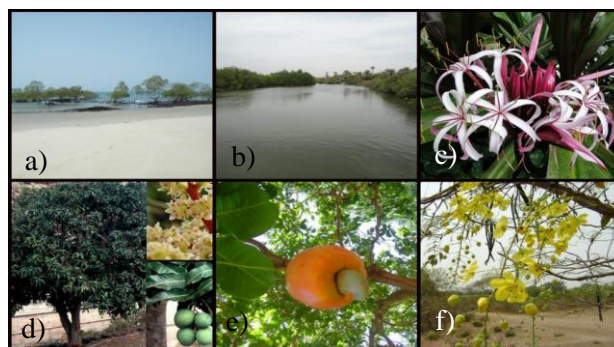


Figura 9- Plantas representadas na análise melissopalínológica: a) *Rhizophora spp.*; b) *Avicennia germinans* e *Elaeis guineensis*; c) *Crinum spp.* (fonte: www.flickr.com); d) *Mangifera indica* (fonte: <http://www.arbolesornamentales.es/Mangiferaindica.htm>); e) *Anacardium occidentale* (fonte: www.flickr.com) e f) *Cassia siberiana*.

Tabela 5- Análise melissopalínológica.

Tipo de pólen/Amostra	Bambadinca	Bula	Pirada	Sonaco	Contubel	Pitche	Bafatá 02	Bafatá 03	Gabú 01	Gabú 02	Gabú 03
<i>Anacardium occidentale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	14 %	-	-
<i>Avicennia germinans</i>	-	10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cassia sieberiana</i>	-	38%	-	16 %	9%	11%	-	15%	-	11%	37%
<i>Corylaceae type</i>	-	-	-	-	8%	-	-	-	-	-	-
<i>Crinum spp.</i>	-	10%	-	13%	-	5%	5%	44%	-	7%	8%
<i>Cyperaceae</i>	-	-	-	-	-	-	7%	-	-	-	-
<i>Elaeis guineensis</i>	-	14%	-	-	-	-	-	-	28%	6%	21%
<i>Iodes type</i>	-	10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mangífera indica</i>	-	-	4%	-	-	-	5%	-	-	-	-
<i>Morus type</i>	89%	-	-	-	-	-	-	10%	12%	-	-
<i>Parkia biglosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	7%	-	-	-
<i>Poaceae</i>	-	-	-	-	-	-	11%	-	-	-	-
<i>Rhizophora spp</i>	2%	5%	43%	33%	30%	38%	40%	15%	24%	28%	-
<i>Terminalia macroptera</i>	3%	10%	38%	16%	35%	34%	12%	-	6%	38%	11%

A classificação da origem floral do mel é realizada com base na percentagem de pólen presente no néctar, refletindo por um lado a quantidade de néctar recolhido numa determinada espécie, mas também a apetência que essa planta tem para a produção de pólen. Quando o pólen provém maioritariamente de uma só espécie, o mel é classificado como monofloral, enquanto um mel contendo pólen de diversas origens florais é denominado de multifloral. A definição da quantidade de pólen de uma espécie necessário para a classificação como monofloral é normalmente definida como mínimo de 45%, no entanto, este valor pode variar de acordo com a capacidade que a planta tem para produzir pólen. Assim, um mel de rosmaninho (uma planta fraca produtora de pólen) pode ser classificado como mel monofloral se a quantidade de pólen for superior a 15%, enquanto para o mel de castanheiro (uma planta com produção elevada de pólen) a classificação como monofloral requer a presença de pólen acima de 86%. A classificação dos méis em estudo está condicionada pelo desconhecimento da capacidade de produção de pólen das plantas envolvidas, no entanto, o mel de Bambadinca apresenta uma quantidade de pólen

de amoreira (*Morus type*) tão elevada que permite com alguma confiança classificar este mel como monofloral. A amostra de Bafatá 03 apresenta também um valor significativo de pólen de lírio, no entanto o valor de 44% não permite classificar com certeza a sua monofloralidade.

3.1.2. Cor

A identificação colorimétrica das amostras de mel presentes neste estudo foi realizada de acordo com a escala de Pfund. Os resultados evidenciaram um mel com uma predominância cromática de âmbar escuro com a maioria das amostras a apresentar valores acima dos 140 mm Pfund, Tabela 6. Os méis Gabú 03, com uma cor âmbar claro (83 mm Pfund) e Bafatá 03, com cor âmbar extra claro (46 mm Pfund) foram as exceções.

Tabela 6- Parâmetros físico-químicos: cor, matéria- insolúvel, humidade e condutividade.

Amostra	Cor (mm Pfund)	Matéria Insolúvel (g100g ⁻¹)	Humidade (%)	Condutividade (µScm ⁻¹)	
Bambadinca	150 ± 0 ^c	Âmbar escuro	0,07 ± 0,02 ^{abc}	15,5 ± 0,1 ^a	856,3 ± 1,9 ^k
Bula	150 ± 0 ^c	Âmbar escuro	0,02 ± 0,02 ^{ab}	17,0 ± 0,0 ^c	829,0 ± 0,8 ⁱ
Pirada	150 ± 0 ^c	Âmbar escuro	0,14 ± 0,04 ^{cd}	19,2 ± 0,0 ^e	613,5 ± 0,5 ^c
Sonaco	150 ± 0 ^c	Âmbar escuro	0,18 ± 0,04 ^d	18,2 ± 0,0 ^d	661,3 ± 0,9 ^f
Contubel	150 ± 0 ^c	Âmbar escuro	0,10 ± 0,02 ^{abcd}	19,2 ± 0,0 ^e	667,7 ± 0,5 ^g
Pitche	149 ± 2 ^c	Âmbar escuro	0,11 ± 0,01 ^{bcd}	19,0 ± 0,3 ^e	627,7 ± 0,5 ^d
Bafatá 02	150 ± 0 ^c	Âmbar escuro	0,33 ± 0,05 ^e	19,6 ± 0,0 ^f	846,0 ± 0,8 ^j
Bafatá 03	46 ± 1 ^a	Âmbar extra claro	0,09 ± 0,03 ^{abc}	18,0 ± 0,0 ^d	335,7 ± 0,5 ^a
Gabú 01	150 ± 0 ^c	Âmbar escuro	0,03 ± 0,02 ^{ab}	15,9 ± 0,0 ^b	493,0 ± 0,0 ^b
Gabú 02	149 ± 1 ^c	Âmbar escuro	0,14 ± 0,05 ^{cd}	19,1 ± 0,0 ^e	638,0 ± 0,8 ^e
Gabú 03	83 ± 1 ^b	Âmbar claro	0,01 ± 0,01 ^a	19,0 ± 0,0 ^e	780,0 ± 0,0 ^h

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($P < 0,05$).

A cor é um dos parâmetros mais relevantes em termos comerciais, efetivamente, no mercado mundial méis mais claros têm uma maior aceitação no mercado alcançando preços mais elevados em detrimento aos escuros. Em termos de qualidade as diferenças de cor não refletem obrigatoriamente um mel de melhor ou pior qualidade, mas estão relacionadas com as diferenças na sua origem botânica, idade, manuseamento, processamento e armazenamento (por exemplo, o escurecimento pode ser provocado pelas reações de Maillard e temperatura na qual o mel amadurece na colmeia). Geralmente, os méis mais claros apresentam um aroma e sabor mais leve, enquanto os méis mais escuros, mais aromáticos e intensos apresentam uma maior percentagem em sais minerais.⁷¹

3.1.3. Matéria insolúvel

A componente insolúvel em água presente no mel pode incluir cera, pólen, detritos provenientes dos favos de mel, abelhas e partículas de sujidade resultantes do processo de extração. A medição da matéria insolúvel em água é importante para detetar o nível de impurezas no mel e que de acordo com o Codex alimentar¹³ não poderá ultrapassar os 0,5% para o mel prensado e 0,1% para outros tipos de mel. Este parâmetro é particularmente relevante para a análise qualitativa dos méis da Guiné-Bissau, devido ao estado de desenvolvimento da atividade apícola e à aplicação de metodologias tradicionais na produção.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, mais de 50% das amostras apresentam valores abaixo dos 0,1% definido para o mel centrifugado, no entanto, há diversas amostras que apresentam valores mais elevados atingindo os 0,3 % na amostra de Bafatá 02. Este valor, apesar de superior aos 0,1%, encontra-se abaixo do regulamentado para o mel prensado, pelo que se considerarmos as práticas tradicionais aplicadas no processamento do mel que passam pelo corte dos favos com consequente prensagem do mel antes da centrifugação justificam os valores encontrados. Comparativamente as amostras que contêm uma maior percentagem de matéria insolúvel referem-se às amostras dos primeiros anos de recolha, 2010, 2011 e 2012, o que pode revelar uma evolução no manuseamento mais cuidado por parte dos apicultores. Em todo o caso, a formação em práticas de higiene e segurança alimentar para os apicultores, incidindo sobre a correta forma de colher, manipular, processar, embalar o mel para o mercado e

facilitar o acesso a equipamentos de processamento adequados pode ajudar a ultrapassar este problema.⁷²

3.1.4. Humidade

O teor de água ou humidade no mel depende de vários fatores tais como a época de produção e colheita, as condições meteorológicas, a origem botânica, as técnicas de processamento e mesmo as condições de armazenamento.^{73,74,75} Este conteúdo afeta algumas das propriedades físicas do mel, particularmente a viscosidade e a cristalização, bem como outros parâmetros como a cor o paladar ou o tempo de conservação.⁷⁴ O nível de humidade do mel é utilizado frequentemente com indicador de frescura ou tempo de prateleira. Um valor anómalo muito reduzido poderá indicar a presença de um mel com elevado tempo de armazenamento, enquanto elevados teores de humidade podem permitir a fermentação do mel por ação de leveduras presentes, capazes de fermentar o açúcar em álcoois e derivados, substâncias estas que alteram significativamente as características do mel.⁷⁶

O teor de humidade nas amostras analisadas apresenta uma oscilação entre os 15% e os 20%, Tabela 6, os quais se encontram de acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos internacionalmente ($\leq 20\%$).¹³ A amostra Bafatá 02 é a que revela um teor mais elevado de água, em oposição, Bambadinca é a amostra que revela menores valores neste parâmetro, com valores próximos de 15%. Comparativamente com os valores de humidade encontrados para os méis Portugueses, estes valores são mais elevados, o que se justifica pelas condições climatéricas tropicais da Guiné-Bissau.

3.1.5. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica do mel está intimamente relacionada com a concentração de sais minerais, ácidos orgânicos, proteínas, conteúdo de cinzas, pH, acidez e outras substâncias iónicas presentes no mel.^{77,78} Valores elevados podem refletir um mel com um maior teor de ácidos orgânicos e matéria inorgânica. Este parâmetro é considerado um bom critério para apoiar a determinação da origem botânica do mel, nomeadamente para a discriminação entre o mel de melada e mel de néctar, assim como a caracterização dos méis monoflorais. Hoje em dia, é um parâmetro utilizado como rotina no controlo de qualidade do mel, substituindo a análise do teor em cinzas.⁷⁹ Os méis com

valores de condutividade elétrica superiores a $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ são considerados méis de melada, enquanto aqueles que expressam valores inferiores a $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ são considerados méis de néctar ou misturas de vários néctares.⁸⁰ Há, no entanto, alguns méis monoflorais com condutividades específicas elevadas, como por exemplo o mel de castanheiro, para o qual é permitido que a condutividade exceda o valor de $800 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Para as amostras de mel da Guiné os valores de condutividade variaram entre os $336 \mu\text{Scm}^{-1}$ e os $856 \mu\text{Scm}^{-1}$, Tabela 6. Estes valores permitem concluir que os méis em estudo são maioritariamente classificados como méis de néctar. Excetua-se as amostras Bafatá 02, Bula e Bambadinca, onde o valor encontrado ultrapassa ligeiramente o limite estipulado para estes méis segundo o Codex alimentar,¹³ pelo que poderão ser equacionados como méis de melada. No entanto, e de acordo com os resultados da análise melissopalínológica, os teores polínicos destes méis são elevados, encontrando-se para o mel Bula uma razão máxima entre os elementos de melada e o pólen (HDE/P) de 0,48, muito abaixo do valor de 3 esperado para méis de melada.⁷⁰ Por essa razão, salvaguarda-se a possibilidade de os méis referidos provirem de origens florais de elevado teor em sais minerais e ácidos orgânicos.

O valor da condutividade elétrica está frequentemente associado com a cor devido à maior mineralidade dos méis escuros, o que se comprova também neste estudo onde a amostra Bafatá 03, a mais clara, apresenta um valor de condutividade abaixo de $400 \mu\text{Scm}^{-1}$.

3.1.6. Acidez

A acidez do mel está relacionada com a presença de diversos ácidos orgânicos, em particular o ácido glucónico em equilíbrio com as suas formas lactónicas ou esterificadas, assim como com a presença de alguns iões inorgânicos, tais como fosfato, sulfato e cloreto.⁷⁷ Este parâmetro é uma componente de extrema relevância na avaliação da qualidade do mel, pois além de conferir características químicas e sensoriais, contribui para a sua estabilidade frente ao desenvolvimento de microrganismos.⁷⁸ A avaliação da acidez do mel pode ser realizada através da determinação do valor de pH, da acidez livre, lactónica ou acidez total.⁸¹ A sua variação nos diferentes méis deve-se particularmente à proveniência floral do néctar e à oscilação causada pela época de colheita,⁵⁶ pelo que o seu valor, para além da informação sobre a origem floral, pode indiciar a presença de

fermentação.⁷⁹ É reconhecido que no processo de fermentação a glicose e a frutose são convertidos em dióxido de carbono e álcool, que na presença de oxigênio pode ser hidrolisado e convertido em ácido acético, contribuindo para um aumento do teor em ácidos livres no mel.⁷⁵ Altos níveis de ácidos livres são característicos da ocorrência de fermentação dos açúcares presentes nas amostras sujeitos à presença de leveduras.

Tabela 7- pH e acidez das amostras de mel

Amostra	pH inicial	Livre a pH=7 (meqKg ⁻¹)	Livre a pH=8,3 (meqKg ⁻¹)	Lactónica (meqKg ⁻¹)	Total (meqKg ⁻¹)
Bambadinca	3,6 ± 0,1 ^a	27 ± 2 ^b	32 ± 2 ^b	50 ± 3 ^c	76 ± 4 ^{bc}
Bula	3,5 ± 0,1 ^a	30 ± 4 ^{bc}	43 ± 2 ^c	40 ± 2 ^b	71 ± 2 ^b
Pirada	3,8 ± 0,0 ^a	36 ± 5 ^{cde}	57 ± 1 ^e	41 ± 0 ^{bc}	79 ± 4 ^{cde}
Sonaco	3,8 ± 0,0 ^a	38 ± 1 ^{cde}	55 ± 3 ^{de}	44 ± 2 ^{bc}	82 ± 0 ^{cde}
Contubel	3,8 ± 0,1 ^a	39 ± 2 ^{def}	54 ± 3 ^{cde}	39 ± 2 ^b	78 ± 1 ^{bcd}
Pitche	3,8 ± 0,1 ^a	36 ± 3 ^{cde}	50 ± 2 ^{cde}	41 ± 2 ^{bc}	77 ± 1 ^{bcd}
Bafatá 02	3,9 ± 0,0 ^a	45 ± 1 ^f	61 ± 2 ^e	42 ± 2 ^{bc}	87 ± 1 ^e
Bafatá 03	3,6 ± 0,3 ^a	16 ± 2 ^a	22 ± 4 ^a	31 ± 3 ^{bc}	46 ± 1 ^a
Gabú 01	3,2 ± 0,1 ^a	32 ± 4 ^{bcd}	46 ± 1 ^{cd}	46 ± 1 ^c	80 ± 1 ^{cde}
Gabú 02	3,9 ± 0,1 ^a	42 ± 3 ^{ef}	47 ± 4 ^{de}	45 ± 3 ^{bc}	85 ± 2 ^{de}
Gabú 03	3,6 ± 0,2 ^a	41 ± 1 ^{ef}	58 ± 2 ^e	41 ± 1 ^{bc}	82 ± 2 ^{cde}

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Neste trabalho, a avaliação da acidez do mel foi realizada através da avaliação do pH, bem como da acidez livre, lactónica e total, Tabela 7. Os valores de pH apresentaram uma variação entre 3,2 e 3,9 em concordância com os valores encontrados frequentemente para o mel e que revelam um caráter ácido. Para a avaliação da acidez livre aplicaram-se duas metodologias de avaliação, nomeadamente através da titulação ao ponto de equivalência e a pH fixo de 8,3. Estas duas metodologias são descritas na bibliografia para a determinação deste parâmetro.²³ Os resultados para a acidez livre

determinada no ponto de equivalência variou entre os 16 e 45 meqkg⁻¹, enquanto para a determinação a pH 8,3 os valores subiram para um intervalo de 22 a 61 meqkg⁻¹, Tabela 7. De acordo com o Codex alimentar¹³ a acidez máxima é de 50 meqkg⁻¹, embora existam alguns tipos de méis nas regiões tropicais que apresentam um teor natural de acidez mais elevado.⁸² Apesar de globalmente os valores da acidez serem elevados, se se considerar o valor da acidez obtido a pH equivalente, todos os méis se encontram dentro dos parâmetros regulamentares. No entanto, quando se aplica a determinação a pH 8,3 o valor sobe de tal forma que a maioria das amostras ultrapassa o limite máximo de 50 meqkg⁻¹. Para a acidez lactónica os valores são também muito altos, oscilando entre 30 e 50 meqkg⁻¹ o que se reflete em valores de acidez total para os méis superiores a 70 meqkg⁻¹. Estes valores podem indicar algum nível de fermentação indesejável.

3.1.7. Hidroximetilfurfural (HMF)

A presença de açúcares simples no mel (glucose e frutose) combinado com o seu carácter ácido favorece a produção de hidroximetilfurfural (HMF), um aldeído cíclico produzido como resultado da degradação dos açúcares, Figura 6.⁷⁵ O teor de HMF, praticamente inexistente no néctar, é considerado um indicador de qualidade no mel e da sua frescura, podendo o seu valor aumentar com a temperatura, com teores de humidade elevados, armazenamento inadequado ou com a adição de açúcar invertido.^{77,81} A União Europeia através da Diretiva da UE 110/2001, estabelece um limite máximo de 40 mgkg⁻¹, excetuando-se os méis com origem em países ou regiões tropicais onde o valor poderá atingir os 80 mgkg⁻¹ devido às altas temperaturas, as quais provocam naturalmente um alto conteúdo de HMF, sem que isso represente um sobreaquecimento ou adulteração do mel.⁷⁵

Os valores observados para as amostras de mel analisadas oscilaram entre os 4 mgkg⁻¹ e os 82 mgkg⁻¹, Tabela 8, verificando-se que a maioria dos méis possuem valores ligeiramente superiores a 40 mgkg⁻¹. Com exceção da amostra de Bambadinca que ultrapassa os valores máximos admissíveis, provavelmente resultado de um mau armazenamento das amostras já indicado nos altos valores de acidez, todas as restantes amostras estão de acordo com os valores previstos para méis proveniente de regiões tropicais como a Guiné-Bissau. As amostras mais recentes, referentes ao ano de 2013

(Gabú 03 e Bafatá 03), apresentam teores em HMF bastante reduzidos, o que poderá também resultar de melhorias na produção e processamento do mel.

Tabela 8- Parâmetros físico-químicos do mel: HMF; índice diastásico e prolina.

Amostra	HMF (mgkg ⁻¹)	Índice Diastásico (DN)	Prolina (mgg ⁻¹)
Bambadinca	82 ± 4 ^e	21,9 ± 0,6 ^{ef}	0,67 ± 0,05 ^{cd}
Bula	51 ± 1 ^d	8,7 ± 0,1 ^a	0,49 ± 0,05 ^b
Pirada	38 ± 1 ^c	22,7 ± 0,1 ^{efg}	0,86 ± 0,01 ^e
Sonaco	48 ± 1 ^d	23,0 ± 0,5 ^{fg}	0,65 ± 0,06 ^{cd}
Contubel	39 ± 0 ^c	20,2 ± 0,7 ^d	0,74 ± 0,02 ^{de}
Pitche	42 ± 3 ^c	21,1 ± 0,9 ^{de}	1,18 ± 0,04 ^f
Bafatá 02	49 ± 0 ^d	16,1 ± 0,1 ^c	0,78 ± 0,05 ^{de}
Bafatá 03	4 ± 0 ^a	20,2 ± 0,3 ^d	0,54 ± 0,04 ^{bc}
Gabú 01	21 ± 1 ^b	12,8 ± 0,2 ^b	0,29 ± 0,05 ^a
Gabú 02	39 ± 1 ^c	23,9 ± 0,4 ^g	0,80 ± 0,03 ^{de}
Gabú 03	8 ± 2 ^a	26,8 ± 0,7 ^h	0,78 ± 0,08 ^{de}

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.1.8. Índice diastásico

A atividade diastásica é outro dos parâmetros de qualidade do mel sensível ao armazenamento e aquecimento, fornecendo informação sobre a frescura do mel e a possibilidade de sobreaquecimento.⁷⁷ O mel é um produto alimentar que contém baixas concentrações de enzimas, destacando-se a diastase, invertase, glucose-oxidase, catalase e fosfatase ácida. Estas enzimas, muito sensíveis à temperatura, provêm de diversas fontes onde se inclui o néctar e os fluidos e secreções das glândulas salivares da faringe das abelhas. A aplicação de altas temperaturas para aquecimento do mel motiva por consequência a degradação destas enzimas, reduzindo o seu teor no mel. Apesar da elevada oscilação que se verifica entre diferentes méis, a legislação estipula um valor

mínimo de 8 unidades de Schade (DN), excetuando-se os casos de méis com teores enzimáticos reconhecidamente baixos como os méis de citrinos onde o valor tem de ser superior a 3 DN.^{23,83}

De acordo com a Tabela 8 podemos verificar que os valores para o conteúdo enzimático das amostras em estudo se encontram entre os 9 e 27 DN, não evidenciando por isso adulterações ou sobreaquecimento.

3.1.9. Prolina

O mel é uma mistura rica em aminoácidos cuja composição é dependente da origem floral. A prolina é o aminoácido livre predominante refletindo também o nível de aminoácidos totais. O teor de prolina presente no mel é utilizado internacionalmente como um critério de maturação, podendo refletir também a presença de adulterações com açúcar, o que a ocorrer provocará a diminuição do teor deste aminoácido. O conteúdo de prolina oscila com a origem botânica do mel, podendo-se encontrar na literatura valores de 0,25 mgg⁻¹ para os méis claros de acácia ou valores superiores a 0,60 mgg⁻¹ para méis de castanheiro ou méis de melada. Apesar de não constar dos critérios de qualidade da União Europeia, é reconhecido que um mel genuíno deverá apresentar teores em prolina superiores a 0,18 mgg⁻¹.²³

Na Tabela 8, podemos observar os valores obtidos para o conteúdo de prolina no mel da Guiné-Bissau, oscilando entre o mínimo de 0,29 mgg⁻¹ encontrado para o mel de Gabú 01 e os 1,18 mgg⁻¹ observados no mel de Pitche. Os valores médios rondam os 0,7 mgg⁻¹, indicando tratar-se de mel maturado e sem adulterações.⁸⁴

3.1.10. Açúcares

O mel é uma solução sobressaturada de açúcares onde a frutose e a glucose surgem como os monossacáridos principais. As elevadas concentrações de diferentes tipos de açúcar são responsáveis por algumas das propriedades físicas e químicas do mel, tais como: viscosidade, densidade, higroscopicidade, capacidade de granulação (cristalização),⁷⁸ as quais são influenciadas principalmente pela origem botânica e geográfica do néctar, mas também pelas condições meteorológicas, de processamento e

armazenamento.⁸⁵ Méis de melada apresentam valores mais baixos de glucose e frutose e níveis mais elevados de oligossacarídeos, principalmente melezitose ou erlose assim, os perfis de hidratos de carbono têm sido utilizados para caraterizar os dois tipos de mel, deste modo a percentagem destes dois monossacáridos não deverá ser menor que 60%, para os méis de néctar e para os méis de melada a percentagem não deverá ser menor que 45%.^{13,86} A sacarose surge, com exceção de alguns néctares ricos em sacarose, como o mel de rosmaninho, e para os quais existem critérios específicos, em muito menor quantidade, resultante da ação da glucose-oxidase depositada adicionada pela abelha durante a recolha e transporte do néctar para a colmeia. O teor em sacarose é usado como critério de despistagem de adulterações no mel, pois um teor de sacarose elevado (superior a 5%) pode resultar da alimentação artificial das abelhas com xarope de sacarose, ou de uma colheita precoce do mel, em que a sacarose não tenha sido decomposta nos monossacáridos.⁷⁶ A quantidade de açúcares presentes no mel não se restringe apenas a estes três, podendo-se encontrar diversos di e trissacarídeos. Estes últimos, como a erlose ou melezitose são particularmente comuns em méis de melada, como resultado da ação de diversas enzimas adicionadas pelos insetos sugadores.

A Figura 10a apresenta o cromatograma obtido para os nove padrões de açúcares analisados no âmbito deste trabalho, frequentemente identificados no mel. O perfil identificado nas diversas amostras mostrou uma composição semelhante, Figura 10b, com elevada presença dos monossacáridos frutose e glucose, e em menores quantidades a turanose, maltulose, maltose e trealose (inexistente na amostra Bula). A sacarose foi apenas detetada numa das amostras (Bafatá 03) mas em percentagem inferior a 1% não comprometendo por isso a qualidade do mel.

Todas as amostras apresentam um teor de frutose superior ao de glucose, representando estes dois monossacáridos em conjunto mais de 60%, o que permite classificar, de acordo com a legislação internacional, todos os méis como méis de néctar. Por outro lado, a ausência do trissacarídeo melezitose, permite confirmar a origem dos açúcares, excluindo-se a contribuição significativa de fontes melada. Estes resultados vêm também confirmar que a condutividade elevada descrita anteriormente para as amostras de Bambadinca, Bula e Bafatá 03 resultam da contribuição de néctares ricos em elementos minerais.

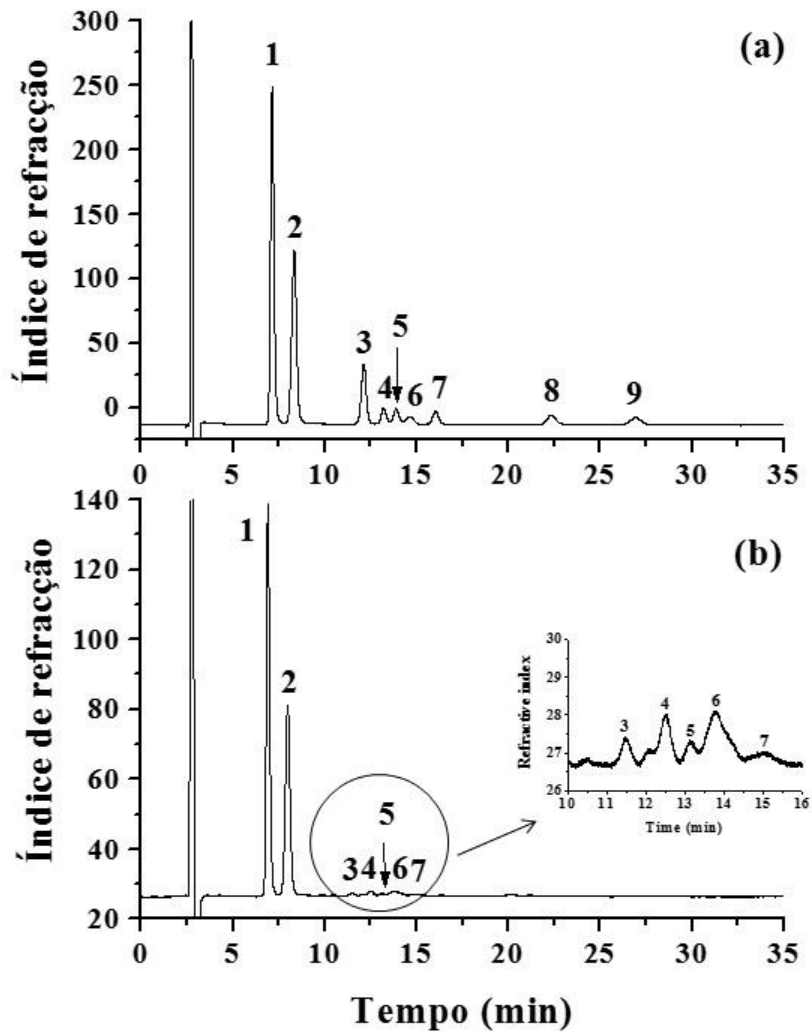


Figura 10- Cromatogramas relativos à análise dos açúcares 1- frutose, 2- glucose, 3-sacarose, 4- turanose, 5- maltulose, 6- maltose, 7- trealose, 8- melezitose, 9- rafinose. a) Solução de padrões; b) Perfil de açúcares da amostra de mel Bafatá 03.

A cristalização é um processo que ocorre de forma natural no mel dependendo da sua composição em açúcares e da humidade, a qual vai diminuindo com o tempo de armazenamento favorecendo o processo de cristalização. O tempo que levará o mel cristalizar depende principalmente das proporções de F/G (frutose/glucose) e G/W (glucose/humidade). Alguns investigadores sugerem que a relação G/W pode ser o melhor indicador para a previsão de cristalização do mel, pelo que quanto maior for o teor

em glucose e menor o teor de água no mel, mais rápida é a cristalização. De acordo com a literatura,⁸⁵ a cristalização de um mel é lenta ou nula quando a relação G/W é inferior a 1,7, e torna-se completa e rápida quando a razão supera o valor de 2. Para as amostras em estudo os valores oscilam entre 1,8 e 2,2 o que sugere uma elevada tendência à cristalização, como aliás se verifica. A razão entre frutose e glucose é também recomendada para avaliar a granulação do mel devido à menor solubilidade da glucose em água relativamente à frutose. Os resultados das amostras revelam uma relação F/G entre os 1,1 e 1,5.⁷⁶ A proporção de frutose e glucose dependem em grande medida da fonte de néctar. A cristalização ou granulação do mel consiste na separação da glucose que é menos solúvel que a frutose e na conseqüente formação de hidratos de carbono em forma sólida, este é um fenómeno natural que ocorre no mel em que todos os méis com o passar do tempo cristalizam-se.⁸⁷ Muitos investigadores relataram um valor médio de proporção F/G cerca de 1,2.⁸⁵

Tabela 9- Perfil do mel em açúcares, obtido por HPLC. Valores expressos em g/100g de mel.

Amostra	Frutose	Glucose	Sacarose	Turanose	Maltulose	Maltose	Trealose	Melezitose	Rafinose	Frutose+ Glucose	Frutose/ Glucose	Glucose/ Humidade
Bambadinca	48,8 ± 0,9 ^d	32,4 ± 0,5 ^b	-	1,3 ± 0,1 ^{bcd}	1,1 ± 0,1 ^{cd}	1,1 ± 0,1 ^{bc}	0,8 ± 0,1 ^{ab}	-	-	81,2	1,5	1,8
Bula	33,0 ± 0,7 ^a	30,2 ± 0,4 ^a	-	1,1 ± 0,2 ^{ab}	1,0 ± 0,2 ^{bcd}	0,5 ± 0,1 ^{ab}	-	-	-	63,3	1,1	1,6
Pirada	43,6 ± 0,0 ^c	36,3 ± 0,2 ^c	-	1,1 ± 0,2 ^{ab}	1,0 ± 0,1 ^{bcd}	0,8 ± 0,1 ^{bc}	0,7 ± 0,1 ^{ab}	-	-	79,8	1,2	1,9
Sonaco	44,4 ± 0,3 ^c	36,0 ± 0,3 ^c	-	1,6 ± 0,0 ^d	1,2 ± 0,1 ^{cd}	0,6 ± 0,0 ^{ab}	0,9 ± 0,1 ^b	-	-	80,3	1,2	2,0
Contubel	43,9 ± 0,2 ^c	36,5 ± 0,0 ^c	-	1,1 ± 0,1 ^{abc}	0,9 ± 0,0 ^{abc}	0,8 ± 0,2 ^{ab}	0,9 ± 0,0 ^{ab}	-	-	80,4	1,2	1,9
Pitche	44,4 ± 0,2 ^c	35,4 ± 0,3 ^c	-	1,6 ± 0,1 ^d	1,1 ± 0,0 ^{cd}	0,6 ± 0,1 ^{ab}	0,9 ± 0,1 ^b	-	-	79,9	1,3	1,9
Bafatá 02	42,2 ± 1,6 ^c	37,4 ± 1,2 ^c	-	1,3 ± 0,2 ^{bcd}	1,2 ± 0,2 ^d	0,6 ± 0,1 ^{ab}	0,8 ± 0,2 ^{ab}	-	-	79,5	1,1	1,9
Bafatá 03	47,9 ± 0,1 ^d	35,5 ± 0,1 ^c	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,0 ^a	2,1 ± 0,5 ^d	0,6 ± 0,1 ^a	-	-	83,4	1,3	2,2
Gabú 01	37,7 ± 0,1 ^b	35,6 ± 0,3 ^c	-	1,3 ± 0,0 ^{bcd}	1,5 ± 0,1 ^e	0,2 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,0 ^{ab}	-	-	73,3	1,1	2,1
Gabú 02	44,5 ± 0,9 ^c	39,6 ± 0,1 ^d	-	1,5 ± 0,1 ^{cd}	1,1 ± 0,1 ^{cd}	1,3 ± 0,1 ^c	0,9 ± 0,1 ^b	-	-	84,0	1,1	2,1
Gabú 03	37,1 ± 2,1 ^b	30,1 ± 1,6 ^a	-	1,0 ± 0,1 ^{ab}	0,8 ± 0,0 ^{ab}	0,6 ± 0,0 ^{ab}	0,8 ± 0,1 ^{ab}	-	-	67,3	1,2	1,9

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.1.11. Atividade antioxidante *in vitro*

Nos últimos anos tem-se assistido a uma intensa pesquisa sobre as propriedades antioxidantes dos produtos naturais. O conhecimento das importantes funções que os antioxidantes desempenham na inibição dos radicais livres resultantes do metabolismo celular, tem motivado o interesse pela análise destes compostos em diversos produtos alimentares.⁸⁸ No mel, os antioxidantes presentes incluem substâncias de natureza enzimática como a catalase, glucose-oxidase ou peroxidase assim como substâncias não enzimáticas como o ácido ascórbico, o α -tocoferol, carotenóides, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, e compostos fenólicos. Este último grupo, que inclui flavonóides e ácidos fenólicos é considerado um dos mais ativos na capacidade de reter radicais livres. Encontrando-se na literatura relatados de vários estudos identificando e quantificando estes componentes em produtos da colmeia.⁵⁹ A tabela seguinte apresenta os resultados da análise da atividade antioxidante.

Tabela 10- Atividade antioxidante: Fenóis totais, DPPH e Poder redutor.

Amostra	Fenóis Totais (mgGAEg ⁻¹)	DPPH (mgmL ⁻¹)	Poder Redutor (mgGAEg ⁻¹)
Bambadinca	0,29 ± 0,03 ^{ab}	21 ± 1 ^{de}	0,68 ± 0,01 ^{ab}
Bula	0,67 ± 0,02 ^e	10 ± 0 ^a	0,68 ± 0,00 ^{ab}
Pirada	0,72 ± 0,02 ^e	20 ± 1 ^{de}	0,90 ± 0,00 ^{bc}
Sonaco	0,85 ± 0,02 ^g	20 ± 1 ^{de}	0,97 ± 0,01 ^c
Contubel	0,41 ± 0,04 ^c	15 ± 0 ^{bc}	2,84 ± 0,02 ^f
Pitche	0,34 ± 0,04 ^{bc}	12 ± 0 ^{ab}	2,04 ± 0,01 ^e
Bafatá 02	0,55 ± 0,03 ^d	17 ± 1 ^{cd}	1,22 ± 0,01 ^d
Bafatá 03	0,81 ± 0,04 ^{fg}	15 ± 3 ^{bc}	1,43 ± 0,02 ^d
Gabú 01	0,25 ± 0,03 ^a	61 ± 3 ^f	0,89 ± 0,00 ^{bc}
Gabú 02	0,75 ± 0,02 ^{ef}	25 ± 0 ^e	0,91 ± 0,01 ^{bc}
Gabú 03	0,40 ± 0,03 ^c	21 ± 3 ^{de}	0,59 ± 0,00 ^a

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.1.11.1. Fenóis totais

O teor de fenóis totais nas amostras de mel foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, um método colorimétrico de elevada sensibilidade, resposta rápida, precisão e reprodutibilidade.⁸⁹ Nesta reação, a sonda de oxidantes é reduzida pelos antioxidantes presentes nas amostras de mel, o que resulta num complexo de cor azul formada com o reagente ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu) com um máximo de absorção a 745-765 nm. Os resultados da reação de Folin-Ciocalteu nas amostras de mel devem ser interpretados como uma estimativa quantitativa do teor de fenóis uma vez que é conhecida a capacidade dos açúcares redutores interferir na reação de complexação descrita anteriormente. No entanto, considerando que a componente dos açúcares dará um contributo idêntico para as diferentes amostras, pode interpretar-se os resultados como o reflexo de diferenças no conteúdo de compostos fenólicos. A determinação do teor em compostos fenólicos neste trabalho foi realizada por comparação com o ácido gálico, Figura 11a, sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico. Os valores obtidos para as amostras de mel variaram entre um máximo de 0,85 mgGAEg⁻¹ para a amostra de Sonaco e um mínimo de 0,25 mgGAEg⁻¹, encontrado na amostra de Gabú 01, Figura 11b. Estes valores são ligeiramente inferiores aos verificados em amostras de mel da África do Sul,⁹⁰ onde se obtiveram valores compreendidos entre 0,7 mgGAEg⁻¹ e 1,7 mgGAEg⁻¹. Esta diferença poderá ser justificada pelas diferenças no processamento e pela origem floral.

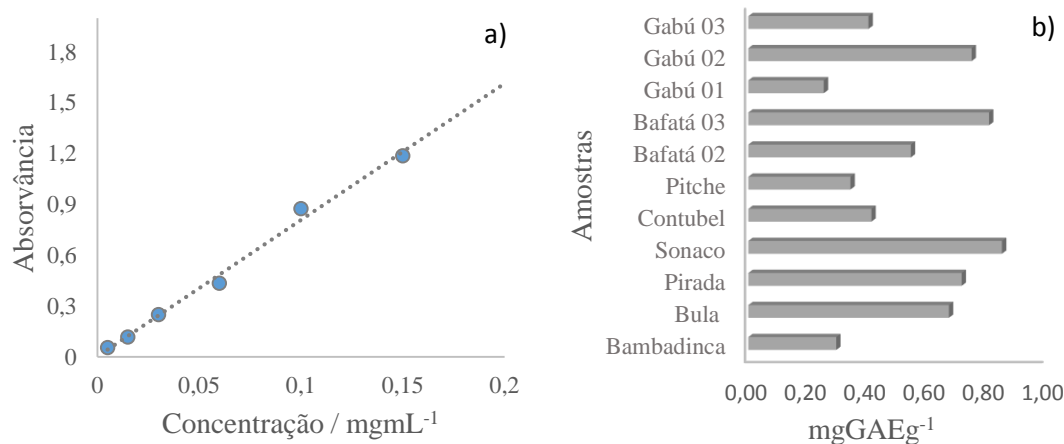


Figura 11- (a) Reta de calibração para o padrão ácido gálico; (b) Teor em fenóis totais no mel.

3.1.11.2. Efeito bloqueador de radicais livres

Uma das metodologias analíticas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* é através da capacidade bloqueadora de radicais livres, a qual pode ser expressa através do parâmetro EC_{50} que representa a concentração da amostra em análise necessária para inibir 50% dos radicais livres. Deste modo, quanto mais elevado é o valor de EC_{50} menor será a capacidade da amostra em análise para neutralizar os radicais. A determinação deste parâmetro para as diferentes amostras de mel foi efetuada com base na sua ação sobre os radicais de DPPH.⁸⁸ A diminuição da absorvância com a adição de amostra é acompanhada por uma descoloração da cor púrpura do DPPH, Figura 7.⁸⁹ A amostra que evidencia atividade antioxidante mais elevada é a amostra de Bula com um valor de EC_{50} de 10 mgmL^{-1} , contrariamente à amostra Gabú 01, que apresenta um valor de EC_{50} de 61 mgmL^{-1} , como se pode observar pelo gráfico da Figura 12.

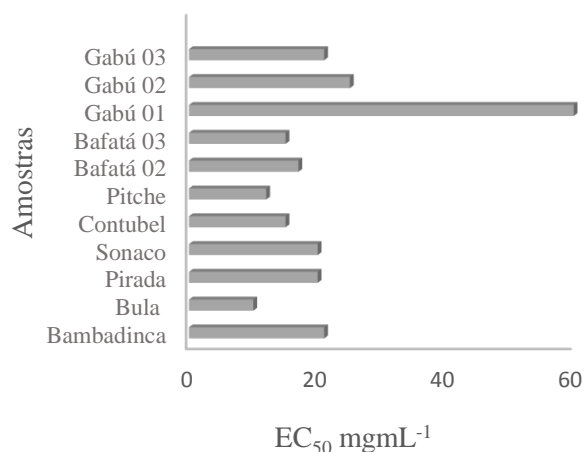


Figura 12- Valores de EC_{50} para as amostras de mel.

Comparando os resultados obtidos com os da literatura, Ferreira et al. (2009)⁵⁹ encontraram valores de EC_{50} entre 107 e 169 mgmL^{-1} , superiores aos valores das amostras da Guiné e por isso com menor atividade antioxidante. Esta distinção poderá resultar da diferença na origem floral. O valor da capacidade bloqueadora de radicais livres na amostra de Gabú 01 é claramente inferior a todas as restantes amostras, correspondendo também a uma das amostras com menor condutividade. Geralmente a capacidade bloqueadora de radicais livres relaciona-se com a concentração fenólica, como aliás se

pode verificar nos resultados deste trabalho, com a amostra de Gabú 01 a apresentar simultaneamente uma menor atividade bloqueadora e uma menor quantidade de compostos fenólicos, enquanto a amostra de Bula é uma das amostras que contém uma maior quantidade deste tipo de compostos.

3.1.11.3. Poder redutor

A capacidade de redução de um composto pode servir também como um indicador significativo potencial antioxidante de uma amostra, nomeadamente através da redução do complexo férrico desenvolvido entre o ião Fe^{3+} e a tripiriltriazina, na presença de antioxidantes, observando-se o desenvolvimento de uma cor azul intensa.^{91,92} Na Figura 13 estão representados os valores das amostras para a avaliação do poder redutor, expressos em equivalentes de ácido gálico no que se pode observar que a amostra de Contubel ($2,8 \text{ mgGAEg}^{-1}$) apresenta o valor mais elevado, e a amostra Gabú 03 ($0,6 \text{ mgGAEg}^{-1}$) o valor mais reduzido. Na comparação do poder redutor com a capacidade bloqueadora de radicais livres pode observar-se que o comportamento das amostras é ligeiramente diferente. Este comportamento significa que os fatores que afetam a capacidade redutora e o efeito bloqueador de radicais livres não são exatamente os mesmos, servindo assim as duas técnicas como complementares na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*.

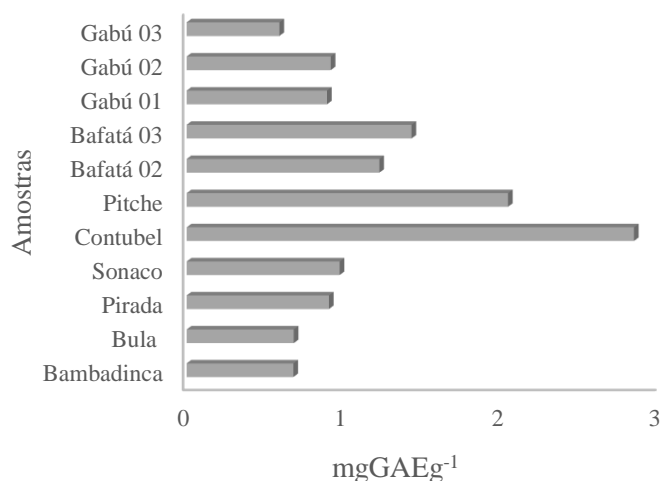


Figura 13- Poder redutor das amostras de mel

3.2. Própolis

A composição química da própolis é afetada pelas condições climáticas, pela espécie de abelha e principalmente pela flora dominante na região circundante à colônia. A própolis é um produto da colmeia sem tradição na Guiné-Bissau, pelo que a sua recolha pelos apicultores é negligenciada. No entanto, e como nas últimas décadas a própolis e outros produtos apícolas ganharam o interesse dos consumidores, devido ao seu alto valor biológico comprovado através de múltiplos efeitos sobre o tratamento e também na prevenção,⁹³ neste trabalho efetuou-se a caracterização de uma amostra recolhida na região de Bula. Para a caracterização analisaram-se a cor, o teor em água, ceras e cinzas, Tabela 11, bem como o conteúdo em compostos fenólicos (conteúdo balsâmico, fenóis totais e flavonóides). Para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da própolis estudou-se o efeito bloqueador de radicais livres e o poder redutor.

Tabela 11- Parâmetros físico-químicos da própolis

L*	Cor			Teor água (%)	Teor Ceras (%)	Teor Cinzas (%)
	a*	b*	C*ab			
36,2 ± 0,3	5,3 ± 0,6	14,7 ± 1,2	15,6 ± 1,3	3,86 ± 0,09	38 ± 4	4,0 ± 0,3

3.2.1. Cor

Uma das primeiras propriedades utilizadas para descrever comercialmente a própolis é a sua cor. As cores da própolis podem variar desde a amarelo, vermelho, verde, castanho claro ou escuro, dependendo da origem da planta e idade que dependem da sua composição química. Para avaliar o parâmetro da cor da própolis, recorreu-se ao sistema de cor CIELAB. O sistema CIELAB é uma escala de cor tridimensional, Figura 14a, aproximadamente uniforme, amplamente utilizada para avaliar os corantes alimentares.³⁸ Nesta escala, as coordenadas de L* medem o grau de luminosidade, a* e b* são as componentes cromáticas que correspondem aos eixos horizontais que definem as cores verde/vermelho (-60/60) e azul/amarelo (-60/60), respetivamente, Figura 14b. O parâmetro C*ab pode ser utilizado para quantificar a componente da cor total, brilho, cujo valor deriva a partir das coordenadas de a* e b*.³⁸

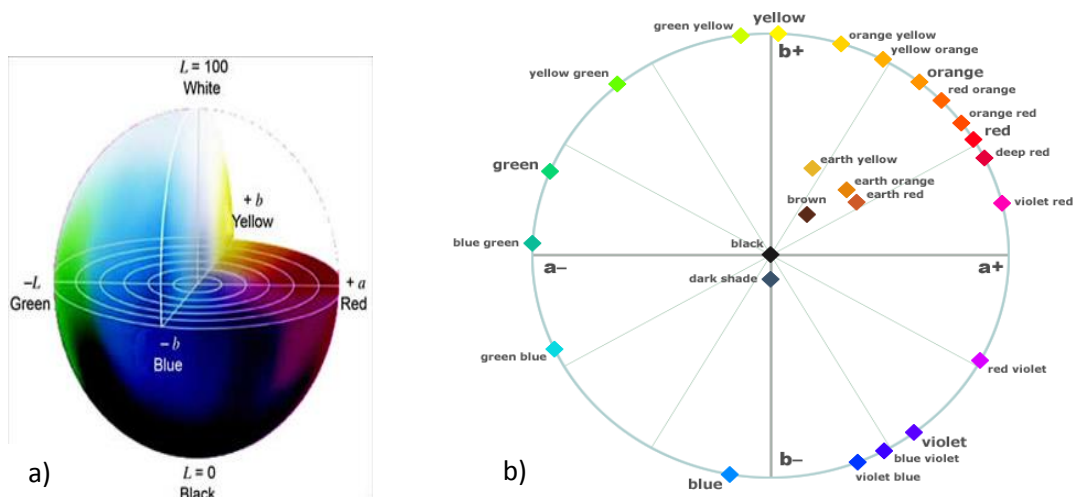


Figura 14- Sistema de cor CIELAB. (fontes: a) <http://www.colorcodehex.com/color-model.html>; b) <http://www.handprint.com/HP/WCL/vismixmap.html>).

De acordo com os valores descritos na Tabela 11, a amostra da própolis apresenta uma componente de luminosidade, L^* , de 36 o que revela uma amostra clara, pois o seu valor é considerado elevado. Relativamente à componente cromática a^* o seu valor é de 5, ou seja a tonalidade desta componente é vermelha, enquanto o valor de b^* é positivo mas relativamente baixo, 15, isto é, a tonalidade indica a cor amarela. Quanto à componente C^*_{ab} a amostra revela um valor abaixo de 20, o que indica que a amostra em estudo exibe um aspeto pouco brilhante. Com este conjunto de características podemos concluir que a amostra apresenta uma cor castanho claro.

3.2.2. Teor de água

O teor de água da própolis é afetado pelas condições de manipulação e pelo tempo de armazenamento e deve ser considerada como um parâmetro de qualidade, uma vez que o elevado teor de compostos fenólicos deste produto é suscetível de degradar com o tempo.³⁸ A amostra em estudo contém um teor de humidade de 4 %, valor este que se encontra dentro dos parâmetros descritos na literatura segundo Falcão et al. (2013)³⁸, recomendando um máximo de 5%.

3.2.3. Teor de ceras

O resultado obtido para o teor de ceras é considerado bastante elevado uma vez que o valor se encontra acima de 31% valor máximo para este tipo de própolis, Tabela 11. A presença de ceras e ácidos gordos na própolis tem origem na cera adicionada pelas abelhas durante o fabrico da própolis, mas provém também das ceras recolhidas nas plantas. O teor de cera na própolis é dependente do método de recolha, do estado da colónia das abelhas e também da época de produção, particularmente devido à disponibilidade de resinas. Um elevado valor deste produto, biologicamente inerte, indica uma baixa percentagem de compostos farmacologicamente ativos, pelo que o seu teor pode afetar o valor comercial da própolis.³⁸ De acordo com os dados disponíveis na literatura³⁸ para a própolis de origem Europeia, o teor em ceras não deverá ultrapassar os 25 a 31%, dependendo da origem floral. O valor encontrado para a amostra de própolis da Guiné-Bissau é superior, podendo a diferença advir da origem botânica desta própolis, ou também do processo de recolha da mesma, realizado por raspagem das paredes da colmeia.

3.2.4. Teor cinzas

O teor em cinzas é um parâmetro qualitativo que reflete a mineralização da amostra e muito particularmente a presença de impurezas devido ao processo de produção, nomeadamente restos de madeira, abelhas, terra, etc, o que resulta num aumento do valor das cinzas.⁹⁴ O valor obtido para este parâmetro foi de 4% para a amostra de própolis da Guiné- Bissau, valor que se encontra no limite máximo permitido, segundo Falcão et al. (2013).³⁸

3.2.5. Conteúdo fenólico

A complexidade fenólica da própolis está relacionada com a diversidade de compostos fenólicos das resinas vegetais, mas também devido à combinação de muitas plantas diferentes visitadas pelas abelhas, principalmente em locais de grande diversidade fitogeográfica.⁴² Estes compostos são descritos como a componente bioativa da própolis,

estando o seu conteúdo relacionado diretamente com o valor comercial. A sua utilização implica um processo prévio de extração, frequentemente numa mistura de etanol e água, sendo que o extrato é referido como o conteúdo balsâmico. Nesta amostra o conteúdo de compostos fenólicos extraídos não ultrapassou os 30%, um valor bastante inferior ao descrito para outros tipos de própolis,³⁸ e que pode ser justificado quer pela diferença na origem floral da amostra quer pelo elevado conteúdo em ceras descrito anteriormente. Para avaliar o perfil deste extrato etanólico efetuou-se a avaliação por espectrofotometria do conteúdo em fenóis totais, flavonas/flavonóis e conteúdo em flavanonas/di-hidroflavonóis, Tabela 12 .⁹³

Tabela 12- Conteúdo balsâmico, conteúdo fenólico e atividade antioxidante da própolis.

Conteúdo balsâmico (%)	Conteúdo fenólico			Atividade antioxidante	
	Fenóis Totais (%)	Flavonas e Flavonóis (%)	Flavanonas e Di-hidroflavonóis (%)	EC ₅₀ DPPH· (mgmL ⁻¹)	Poder redutor (mgeqg ⁻¹)
26,3 ± 4,1	2,5 ± 0,1	0,071 ± 0,003	1,80 ± 0,03	0,142 ± 0,004	90 ± 7

3.2.5.1. Fenóis totais

A avaliação dos fenóis totais foi realizada através da mesma metodologia aplicada para o mel, no entanto, devido à composição química da própolis, a reta de calibração utilizada para comparação dos resultados foi uma mistura de ácido caféico:galangina:pinocembrina, de modo a representar mais adequadamente as características da matriz, Figura 15. O valor obtido para a amostra de própolis foi de 2,5%, um valor significativamente baixo mesmo quando comparado com o mínimo de 6% descrito para alguns tipos de própolis mais pobres em compostos fenólicos.³⁸

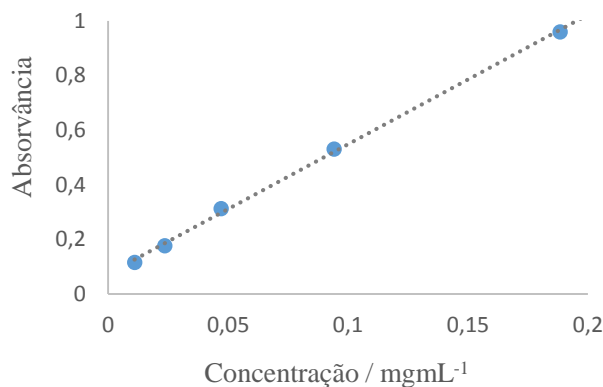


Figura 15- Teor em fenóis totais: padrão de ácido cafeico:galangina:pinocembrina.

3.2.5.2. Flavonóides

A avaliação do teor em flavonóides foi realizada através da quantificação das flavonas/flavonóis pelo método do cloreto de alumínio e das flavanonas/di-hidroflavonóis pelo método do DNP. Também para estes dois parâmetros os valores encontrados são significativamente reduzidos quando comparados com os valores observados para outras própolis.³⁸ Para as flavonas/flavonóis o teor encontrado é praticamente irrelevante quando comparado com o mínimo de 2% descrito, enquanto o teor de flavanonas/di-hidroflavonóis (1,8%) já se aproxima do mínimo descrito de 3% para outras amostras de própolis. Globalmente pode concluir-se que a própolis analisada se aproxima mais das características fenólicas encontradas em própolis do Brasil, onde a componente em flavonóides é bastante mais reduzida que a componente em ácidos fenólicos.³⁹

3.2.6. Atividade antioxidante *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante da própolis foi também realizada através das metodologias *in vitro* aplicadas no estudo do mel, nomeadamente a capacidade bloqueadora de radicais livres de DPPH e pela capacidade redutora do ião Fe^{3+} . Os valores recomendados para estes dois métodos estão descritos também na literatura para a própolis Portuguesa, definindo-se um mínimo de 96 mgeqg^{-1} para o poder redutor da própolis e um máximo de $0,06 \text{ mgmL}^{-1}$ para o valor de EC_{50} da capacidade bloqueadora de radicais. Como seria de prever considerando a reduzida composição de compostos fenólicos observados na própolis da Guiné-Bissau, os valores encontrados foram mais

baixos, Tabela 12, particularmente no que se refere ao valor de EC_{50} onde o valor verificado foi de $0,14 \text{ mgmL}^{-1}$. Relativamente ao poder reductor o valor aproximou-se do mínimo recomendado atingindo 90 mgeqg^{-1} .

Capítulo IV

Conclusão



4. Conclusão

A implementação do projeto de desenvolvimento rural EuropeAid/128139/L/ACT/GW “Valorização da apicultura nas regiões de Bafatá e Gabú: produção, transformação e comercialização”, comprova uma melhoria das condições de produção e processamento, atestado pela evolução dos resultados analíticos realizados no âmbito deste estudo. Esta melhoria foi conseguida por transmissão de novos conceitos introduzidos nas diferentes regiões deste país Africano, nomeadamente o recurso a colmeias do tipo queniano, a cresta de favos isentos de criação e a redução da aplicação de prensagem no processo de extração. A comparação entre a qualidade das amostras de Pirada, Sonaco, Contubel, Pitche, Bafatá 02 e Gabú 02, e as amostras mais recentes, Bafatá 03 e Gabú 03, todas obtidas na mesma unidade de processamento de mel, indicam um melhoramento em todo o processo, apesar de ainda ser evidente a necessidade de aumentar os níveis de qualidade, provavelmente pela redução da quantidade de mel produzido por metodologias tradicionais com recurso à prensagem.

Os resultados obtidos para a análise melissopalínológica comprovaram que as amostras de mel apresentaram uma grande diversidade no que diz respeito aos grãos de pólen identificados. Nesta análise destacaram-se duas plantas, a *Rhizophora spp.* (tarafe) e a *Terminaria macroptera* (macete) presentes em quantidades significativas em quase todas as amostras e muito abundantes em áreas húmidas junto às margens rios. De acordo com o perfil polínico observado alguns méis poderão ser classificados como monoflorais, como é o caso da amostra de mel de amoreira de Bambadinca onde predomina claramente o pólen de *Morus type*, e a amostra Bafatá 03 que apresenta uma percentagem considerada elevada de pólen de lírio (*Crinum spp.*). Todas as restantes amostras apontam para amostras multiflorais, identificando-se no mel de Bafatá 02 mais de 20 tipos de pólen diferentes. A análise polínica, para além de identificar a origem floral do néctar presente no mel, transmite também muita informação suplementar, como a relação HDE/P, que neste caso permitiu classificar todas as amostras de mel como méis de néctar, uma vez que o seu valor foi inferior a 0,5. Paralelamente, a quantificação da carga polínica, revelou para a maioria das amostras e em particular as recolhidas no ano de 2012, valores muito elevados indiciando a utilização de prensagem no processo de extração, classificando-se estes méis na classe V. Este aspeto de processamento é limitador na definição da origem floral através da análise polínica, uma vez que a possível contaminação polínica durante o processo de prensagem

poderá induzir em erro a interpretação, devendo a análise do perfil polínico ser realizada com ponderação.

As amostras de mel exibem na generalidade uma tonalidade escura com a exceção do mel Bafatá 03 que apresenta uma cor âmbar extra claro e Gabú 03 que apresentam uma cor âmbar claro. O teor em humidade enquadra-se dentro dos limites estabelecidos, ou seja inferior a 20%, o que permite concluir que o mel extraído se encontra em condições de maturação adequada. Esta observação é confirmada pelo teor de prolina, um parâmetro que permite indicar que o mel é maduro e não contém qualquer tipo de adulteração, visto que todas as amostras contêm teores deste aminoácido superiores a $0,18 \text{ mgg}^{-1}$. Ao nível dos resíduos, a amostra de Bafatá 02 foi a que revelou uma maior percentagem de matéria insolúvel, seguido das amostras Sonaco, Pirada, Gabú 02 e Pitche. Apesar de ligeiramente altos, estes valores encontram-se dentro do expectável para amostras extraídas por prensagem. Os valores das restantes amostras apresentam valores baixos inferiores a 0,1%.

A condutividade elétrica sendo um bom critério para a determinação botânica do mel, permite também classificar os méis como mel de néctar ou de melada. No caso das amostra de Bambadinca, Bula e Bafatá 02 e apesar dos valores observados serem superiores a $800 \mu\text{Scm}^{-1}$, o que sugere que os méis são de melada, a análise polínica e a relação de HDE/P apontou para estas amostras uma classificação como méis de néctar, pelo que o valor elevado da condutividade deverá estar associado às características específicas do néctar presente nestas amostras. Assim poderá concluir-se que todas as amostras analisadas são consideradas como méis de néctar.

O teor de acidez no mel é um parâmetro que depende da origem floral do néctar, encontrando-se os valores mais elevados nos méis com teores de mineralização mais altos, associados muitas vezes aos méis mais escuros. Para os méis em estudo, o teor obtido para a acidez livre a pH 8,3 apresentou em alguns casos valores que ultrapassam o limite admitido de 50 meqkg^{-1} , o que conjugado com os elevados valores encontrados na acidez lactónica poderá ser indicativo da ocorrência de um processo de fermentação. O nível de fermentação das amostras pode ser avaliado diretamente pela presença de hidroximetilfurfural, sendo que para o mel oriundo de zonas tropicais pode atingir um limite mais elevado devido as altas temperaturas que se fazem sentir na Guiné (80 mgkg^{-1}). De acordo com os resultados, apesar dos altos valores encontrados na amostra Bambadinca foi a única que excedeu o limite máximo admissível, 82 mgkg^{-1} . Visto tratar-se de uma amostra do ano de 2010, o elevado teor pode ter surgido de um sobreaquecimento ou uma adulteração no decorrer dos anos.

Através deste parâmetro podemos ainda evidenciar que as amostras mais recentes possuem um valor de HMF muito baixo, o que pode indicar que a produção e processamento do mel sofreram uma melhoria tal como se pretendia com a implementação do projeto de desenvolvimento rural. O conteúdo enzimático das amostras de mel, avaliado através do índice diastásico, apresenta em todos os casos valores elevados. Este resultado permite excluir quaisquer hipóteses de adulteração ou sobreaquecimento, uma vez que esses procedimentos implicariam uma destruição das enzimas, e conseqüentemente redução da diastase. Mesmo para a amostra Bambandica, apesar de apresentar um valor elevado de HMF o nível enzimático mantém-se elevado, o que exclui a hipótese da amostra ter sofrido um sobreaquecimento.

O perfil em hidratos de carbono nas amostras de mel da Guiné-Bissau revelou, tal como esperado, a presença maioritária dos monossacarídeos frutose e glucose, não se identificando a presença de trissacarídeos, mais comuns em méis de melada. A quantidade de frutose e glucose nestes méis ultrapassa em todos os casos os 60%, o que permite a sua classificação como méis de néctar. Adicionalmente, o elevado valor encontrado para a relação entre o teor em glucose e a quantidade de água, G/W, aponta para uma elevada tendência à cristalização das amostras. No que se refere à presença de sacarose, este açúcar apenas foi encontrado na amostra Bafatá 03, mas em quantidade muito inferior aos 5% admitidos de acordo com a legislação.

O conteúdo fenólico das amostras de mel exibiu uma oscilação entre o mínimo de 0,25 mgGAEg⁻¹ encontrados na amostra Gabú 01 e o máximo de 0,85 mgGAEg⁻¹ apresentados pela amostra Sonaco. Apesar deste valor mais elevado, a amostra com maior atividade antioxidante nomeadamente na capacidade bloqueadora de radicais livres de DPPH foi a amostra Bula com um menor valor de EC₅₀, enquanto através do poder redutor a amostra de Contubel foi a amostra mais promissora.

No que se refere à análise qualitativa da própolis, a amostra recolhida na Guiné-Bissau apresentou uma cor castanha clara, um teor de água e cinzas normal de 4%, e um teor de ceras acima do estipulado para a própolis Europeia. Este valor excessivo no teor em ceras poderá estar dependente da origem botânica da amostra, mas também do processo de recolha utilizado pelo apicultor.

A valorização comercial da própolis é frequentemente associada ao seu conteúdo balsâmico resultante do processo de extração da própolis bruta em álcool. O resultado obtido

para a amostra revelou um valor bastante reduzido, inferior a 30 %, condicionando assim o seu valor comercial. Por outro lado, e considerando o extrato obtido, a composição fenólica é claramente diferente da encontrada na própolis de regiões temperadas, com valores relativamente baixos tanto no que se refere ao conteúdo em fenóis totais como para o teor em flavonóides (flavonas/flavonóis; flavanonas/di-hidroflavonóis). De acordo com a literatura³⁸ o teor em fenóis totais mínimo estabelecido é de 6%, sendo que a amostra apresentou um valor inferior aos 3%. Também para as flavonas/flavonóis e para o teor de flavanonas/di-hidroflavonóis o valor da amostra foi aproximadamente metade dos valores mínimos tabelados na bibliografia, nomeadamente de 2 % e 3%, respetivamente. Estes valores da composição fenólica refletem-se na atividade antioxidante da amostra encontrando-se abaixo das expectativas, pois para um valor de EC₅₀ máximo descrito de 0,06 mgmL⁻¹ a amostra apresenta um valor de 0,14 mgmL⁻¹ o que significa a sua fraca apetência para bloquear o radical livre DPPH. Já para o teste do poder redutor a amostra aproxima-se do valor mínimo recomendado de 96 mgeqg⁻¹.

Os resultados deste trabalho são um ponto de partida para a caracterização dos produtos apícolas da Guiné-Bissau, particularmente da região Leste. Os resultados apontam para uma melhoria da qualidade do mel produzido ao longo da implementação do projeto mas também mostram a necessidade de continuar este processo e de atingir particularmente méis com menores níveis de pólen, bem como teores de acidez e HMF mais reduzidos. A redução do uso de prensagem no processo de extração, bem como a separação de favos contendo pólen poderão contribuir para esta evolução.

Ao nível da avaliação da qualidade será importante no futuro reavaliar a origem floral das amostras após a redução do nível de grãos de pólen, bem como alargar a amostragem tanto em número de amostras como na extensão da área de amostragem, de modo a efetuar um levantamento do tipo de mel predominante na Guiné-Bissau. Ao nível da própolis, e dadas as características específicas da flora da região será importante aumentar o número de amostras mas também efetuar uma avaliação do seu perfil fenólico com o objetivo de encontrar novos compostos com bioatividade elevada.

Capítulo V

Referências Bibliográficas



5. Referências Bibliográficas

- [1] Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini A.G. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung*. **2002**, 57, 530–533.
- [2] Isidorov, V.A.; Isidorova, A.G.; Szczepaniak, L.; Czyzewska, U. Gas chromatographic– mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chemistry*. **2009**, 115, 1056–1063.
- [3] Crane, E. *Encyclopedia of Insects (Second Edition)*. Beekeeping. **2009**, 19, 66–71.
- [4] Arruda, V.A.S.; Pereira, A.A.S.; Freitas, A.S.; Barth, O.M.; Almeida-Muradian, L.B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical Composition. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2013**, 29, 100–105.
- [5] Frigerio, C. *Optimização e influência na bioatividade do processo de secagem por radiação infravermelha de amostras de pólen apícola*. Tese (Mestrado em Controlo da Qualidade Água e alimentos). Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. **2009**.
- [6] Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feas, X.; Estevinho, L.M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and antiinflammatory. *Food and Chemical Toxicology*. **2014**, 63, 233–239.
- [7] Akhmetova, R.; Sibgatullin, J.; Garmonov, S.; Akhmetova, L. Technology for extraction of bee-bread from the honeycomb. *Procedia Engineering*. **2012**, 42, 1822–1825.
- [8] Carlos, M.C. *Palinologia y Caracteres Físico- Químicos del Pólen Apicola Producido en España*. Propuesta de Parámetros objetivos de calidad. Tese (Doutoramento em Química analítica, Nutrição y Bramatologia). Universidade de Salamanca, Faculdade de Farmácia; Salamanca; Espanha. **2004**.
- [9] D’Ettorre, P.; Wenseleers, T.T.; Dawson, J.; Hutchinson, S.; Boswell, T.; Ratnieks, F.L.W. Wax combs mediate nestmate recognition by guard honeybees. *Animal Behaviour*. **2006**, 71, 773–779.

- [10] Wytrychowski, M.; Chenavas, S.; Daniele, G.; Casabianca, H.; Batteau, M.; Guibert, S.; Brion, B. Physicochemical characterisation of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2013**, 126–133.
- [11] Matysiak, J.; Schmelzer, C.E.H.; Reinhard, H.H.; Neubert, Kokot, Z.J. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2011**, 54, 273–278.
- [12] Abreu, R.M.M.; Moraes, R.L.M.S.; Camargo-Mathias, M.I. Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Micron*. **2010**, 41, 172–175.
- [13] Codex Standard for Honey. Codex Stan 12-1981. **1981**, 1-8.
- [14] Hosam, M.H.; Fatima, T.; Meqballi, A.L.; Kamal, H.; Usama, D.; Souka; Ibrahim, W.H. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chemistry*. **2014**, 153, 35–43.
- [15] Serem, J.C.; Bester, M.J. Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry*. **2012**, 133, 1544–1550.
- [16] Azeredo, L.C.; Azeredo, M.A.A.; Souza, S.R.; Dutra, V.M.L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*. **2003**, 80, 249-254.
- [17] Downey, G.; Hussey, K.; Kelly, J.D.; Walshe, T.F.; Martin, P.G. Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chemistry*. **2005**, 91, 347–354.
- [18] Olaitan, P.B.; Adeleke, O.E.; Ola, I.O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*. **2007**, 7, 159-165.
- [19] Anklam, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*. **1998**, 63, 549–562.
- [20] Rodríguez, G.O.; Ferrer, B.S.; Ferrer, A.; Rodríguez, B. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*. **2004**, 84, 499-502.

- [21] Finola, M.S.; Lasagno, M.C.; Marioli, J.M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*. **2007**, 100, 1649-1653.
- [22] Küçük, M.; Kolaili, S.; Karaoğlu, S.; Ulusoy, E.; Baltacı, C.; Candan, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*. **2007**, 100, 526-534.
- [23] Bogdanov, S. Harmonised Methods of the International Honey Commission. **2002**, 1-62.
- [24] Sanchez, V.; Baeza, R.; Ciappini, C.; Zamora, M.C.; Chirife, J. Comparison between Karl Fischer and refractometric method for determination of water content in honey. *Food Control*. **2010**, 21, 339–341.
- [25] Suárez-Luque, S.; Mato, I.; Huidobro, J.F.; Jesús; Simal-Lozano. Solid-phase extraction procedure to remove organic acids from honey. *Journal of Chromatography B*. **2002**, 770, 77–82.
- [26] Alves, A.; Ramos, A.; Gonçalves, M.M.; Bernardo, M.; Mendes, B. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2013**, 30, 130–138.
- [27] Alqarni, A.S.; Owayss, A.A.; Mahmoud, A.A.; Hannan, M.A. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*. **2014**, 18, 618-625.
- [28] Carnwath, R.; Graham, E.M.; Reynolds, K.; Pollock, P.J. The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates. *The Veterinary Journal*. **2014**, 199, 110–114.
- [29] Al-Mamary, M.; Al-Meerri, A.; Al-Habori, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. **2002**, 22, 1041-1047.
- [30] Won, S.R.; Lee, D.C.; Ko, S.H.; Kim, J.W.; Rhee, H.I. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*. **2008**, 41, 952-956.

- [31] Dias, M.E.B.C.S. Língua electrónica potenciométrica: uma ferramenta para análise da qualidade do mel. Tese (Mestrado em Química). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. **2013**.
- [32] Sergiel, I.; Pohl, P.; Biesaga, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. **2014**, 145, 404–408.
- [33] Neves, A.F. Caracterização química do mel Alombada e implementação do HACCP. Tese (Mestrado em Biotecnologia, ramo de Biotecnologia Alimentar). Universidade de Aveiro. **2013**.
- [34] Felsner, M.L.; Cano, C.B.; Bruns, R.E.; Watanabe, H.M.; Almeida-Muradian, L.B.; Matos, J.R. Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2004**, 17, 737–747.
- [35] European Honey Directive. Official Journal of the European Communities. <http://www.ihc-platform.net/publications.html>. **2001**.
- [36] Zhang, T.; Omar, R.; Siheri, W.; Al-Mutairi, S.; Clements, C.; Fearnley, J.; Edrada-Ebel, R.A.; Watson, D. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. *Talanta*, **2014**, 120, 181–190.
- [37] Falcão, S.I.; Vale, N.; Gomes, P.; Domingues, M.R.M.; Freire, C.; Cardoso, M.; Vilas-Boas, M. Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*. **2013**, 24, 309-318.
- [38] Falcão, S. Chemical Composition of Portuguese Propolis. Bioactive Properties. Tese (Doutoramento em Química). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. **2013**.
- [39] Falcão, S.I.; Freire, C.; Vilas-Boas, M. A proposal for physicochemical standards and antioxidant activity of portuguese propolis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2013**, 90, 1729-1741.
- [40] Frozza, C.O.S.; Garcia, C.S.C.; Gambato, G.; Souza, M.D.O.; Salvador, M.; Moura, S.; Padilha, F.F.; Seixas, F.K.; Collares, T.; Borsuk, S.; Dellagostin, O.A.; Henriques, J.A.P.;

Roesch- Ely, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*. **2013**, 52, 137–142.

[41] Dias, L.G.; Pereira, A.P.; Estevinho, L.M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology*. **2012**, 50, 4246-4253.

[42] Falcão, S.; Vilas- Boas, M; Estevinho, L.M.; Barros, C.; Domingues, M.R.M.; Cardoso, S.M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2010**, 396, 887-897.

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

[44] Júnior, A.F.; Lopes, M.M.R.; Colombari, V.; Monteiro, A.C.M.; Vieira, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*. **2006**, 36, 1.

[45] Paula, V.M.B. Caraterização química e biológica do própolis da “Serra de Bornes” por TLC. Tese (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Escola Superior Agrária de Bragança. **2012**.

[46] Kujungie, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.U.; Bankova, V.; Christov, R.; Popova S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**, 64, 235–240.

[47] Lustosa, S.R.; Galindo, A.B.; Nunes, L.C.C.; Randau, K.P.; Neto, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2008**, 18, 447-454.

[48] Menezes, H. Artigo de revisão, Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*. **2005**, 72, 405-411.

[49] Valente, M.J.; Baltazar, A.F.; Henrique, R.; Estevinho, L.; Carvalho, M. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte

damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. **2011**, 49, 86–92.

[50] Calhelha, R.C.; Falcão, S.; Queiroz, M.J.R.P.; Vilas-Boas, M.; Ferreira I.C.F.R. Cytotoxicity of Portuguese Propolis: The Proximity of the *In Vitro* Doses for Tumor and Normal Cell Lines. *BioMed Research International*, **2014**, 1-7.

[51] Ohe, W.V.D.; Oddo, L.P.; Piana, M.L.; Morlot, M.; Martin, P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*. **2004**, 35, 18–25.

[52] Louveaux, J.; Maurizio, A.; Vorwohl, G. Methods of Melissopalynology. *Bee World*. **1970**, 51(3), 125-138.

[53] Dimou, M.; Thrasyvoulou, A. Pollen analysis of honeybee rectum as a method to record the bee pollen flora of an area. *Apidologie*. **2009**, 40, 124–133.

[54] Manual de medições de campo do inventário florestal nacional da Guiné-Bissau. Projecto Carboveg–GB. **2009**, 3.1, 25-36.

[55] Alcobia, J.J.F. Manual Prático de Apicultura. Ministério do desenvolvimento rural. Departamento de pesquisa agrícola, **1993**, 1, 78.

[56] Estevinho, L.M.; Feas, X.; Seijas, J.A.; Vazquez-Tato, M.P. Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*. **2012**, 50, 258–264.

[57] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- - Food Science and Technology*. **1995**, 28, 25–30.

[58] Malheiro, R.; Oliveira, I.; Vilas-Boas, M.; Falcão, S.; Bento, A.; Pereira, J. A. Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food and chemical toxicology*. **2009**, 47, 92-97.

[59] Ferreira, I.C.F.R.; Aires, E.; Barreira, J.C.M.; Estevinho, L.M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. **2009**, 114, 1438–1443.

[60] Berker, K.I.; Güçlü, K.; Tor, I.; Apak, R. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho

- phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*. **2007**, 72, 1157-1165.
- [61] AOAC Official methods of analysis, 16th edn. **1995**, AOCS Press, Arlington.
- [62] Woiski, R.G.; Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*. **1998**, 37, 99–105.
- [63] Salatino, A.; Teixeira, É.W.; Negri, G.; Message, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *ECAM*. **2005**, 2, 33–38.
- [64] Al-Mamary, M.; Al-Meerri, A.; Al-Habori, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Resaearch*. **2002**, 22, 1041-1047.
- [65] Singleton, V.; Rossi, J.A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1995**, 16, 144-158.
- [66] Cvec, J.; Medić-Šarić, M.; Jasprica, I.; Zubčić, S.; Vitali, D.; Mornar, A.; Vedrina-Dragojević, I.; Tomić, S. Optimization of an extraction procedure and chemical characterization of Croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*. **2007**, 18, 451–459.
- [67] Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L.; Bogdanov, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*. **2004**, 15, 235–240.
- [68] Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. **1986**, 44, 307–315.
- [69] Belay, A.; Solomon, W.k.; Bultossa, G.; Adgaba, N.; Melaku, S. Botanical origin, colour, granulation, and sensory properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*. **2015**, 167, 213–219.
- [70] Oddo, L.P.; Piro, R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*. **2004**, 35, 38–81.

- [71] Avallone, C.M.; Montenegro, S.; Chifa, C. Control de calidad de las mieles de la provincial del Chaco- Argentina. UNNE – Facultad de Agroindustrias. Em “Galeria Apícola Virtual”. (http://www.beekeeping.com/articulos/mieles_chaco.htm).
- [72] Belay, A.; Solomon, W.K.; Bultossa, G.; Adgaba, N.; Melaku, S. Physicochemical properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*. **2013**, 141, 3386–3392.
- [73] Sanchez, V.; Baeza, R.; Ciappini, C.; Zamora, M.C.; Chirife J. Comparison between Karl Fischer and refractometric method for determination of water content in honey. *Food Control*. **2010**, 21, 339–341.
- [74] Escuredo, O.; Miguez, M.; Fernandez-Gonzalez, M.a.; Seijo, M.C. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*. **2013**, 138, 851–856.
- [75] Khalil, M.I.; Sulaiman, S.A.; Gan, S.H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology*. **2010**, 48, 2388–2392.
- [76] Tornuk, F.; Karaman, S.; Ozturk, I.; Toker, O.S.; Tastemur, B.; Sagdic, O.; Dogan, M.; Kayacier, A. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 46, 124– 131.
- [77] Silva, L.R.; Videira, R.; Monteiro, A.P.; Valentão, P.; Andrade, P.B. Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*. **2009**, 93, 73–77.
- [78] Finco, F.D.B.A.; Moura, L.L.; Silva, I.G. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. Physical and chemical properties of *Apis mellifera* L. hone. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. **2010**, 30, 706-712.
- [79] Silvano, M.F.; Varela, M.S.; Palacio, M.A.; Ruffinengo; Yamul, D.K. Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. *Food Chemistry*. **2014**, 152, 500–507.

- [80] Belay, A.; Solomon, W.K.; Bultossa, G.; Adgaba, N.; Melaku, S. Physicochemical properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*. **2013**, 141, 3386–3392.
- [81] Downey, G.; Hussey, K.; Kelly, J.D.; Walshe, T.F.; Martin, P.G. Preliminary contribution to the characterization of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chemistry*. **2005**, 91, 347–354.
- [82] Oliveira Alves, R.M.O.; Carvalho, C.A.L.; Souza, B.A.; Sodr e, G.S.; Marchini, L.C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **2005**, 25, 644-650.
- [83] Tosi, E.; Martinet, R.; Ortega, M., Lucero, H.; R e, E. (2008). Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*. **2008**, 106, 883–887.
- [84] Truzzi, C.; Annibaldi, A.; Illuminati, S.; Finale, C.; Scarponi, G. Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chemistry*. **2014**, 150,477–481.
- [85] Escuredo, O.; Dobre, I.; González, M.F.; Seijo, M.C. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*. **2014**, 149, 84–90.
- [86] Sanz, M.L.; Gonzalez, M.; Lorenzo, C.; Sanz, J.; Martínez-Castro I. A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry*. **2005**, 91, 313–317.
- [87] Cavia, M.M.; Fernández-Mui no, M.A.; Gómez-Alonso, E.; Montes-Pérez, M.J.; Huidobro, J.F.; Sancho, M.T. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. *Food Chemistry*. **2002**, 78, 157–161.
- [88] Serra, M.C.C. As Propriedades Antioxidantes do Mel. Centro de Estudos de Engenharia Química Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. (<http://www.oapicultor.com/artigos/Propriedades%20anti%20Oxidante.pdf>).

- [89] Alves, A.; Ramos, A.; Gonçalves, M.M.; Bernardo, M.; Mendes B. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2013**, 30, 130–138.
- [90] Serem, J.C.; Bester, M.J. Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. *Food Chemistry*. **2012**, 133, 1544–1550.
- [91] Lim, C.S.H.; Lim, S.L. Ferric Reducing Capacity Versus Ferric Reducing Antioxidant Power for Measuring Total Antioxidant Capacity. *Lab Medicine*. **2013**, 44, 51-55.
- [92] Gomathi, D.; Ravikumar, G.; Kalaiselvi, M.; Vidya, B.; Uma, C. In Vitro Free Radical Scavenging Activity of Ethanolic Extract of the Whole Plant of *Evolvulus Alsinoides* (L.) L. *The Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*. **2014**, DOI 10.1007/s11655-014-1763-0.
- [93] Stan, L.; Mărghitaș, L.A.L.; Dezmirean, D. Quality Criteria for Propolis Standardization. *Animal Science and Biotechnologies*. **2011**, 44, 137- 140.
- [94] Del Prado, C.C.N.; Stefanutto, J.C.; Stevanato, J.O.; Gonçalves, J.E.; Yamaguchi, U.M.; Franco, S.L. Análise química da própolis de diferentes regiões do Paraná e formulações de própolis para ser usados com enxaguantes bucais.. **2013**, ISBN 978-85-8084-603-4.

Capítulo VI

Anexos



6. Anexos

Em anexo segue-se a tabela completa da análise melissopalínológica com as respetivas famílias das plantas e nomes comuns, e em seguida dois dos resumos que resultaram de uma comunicação em painel e uma comunicação oral.

Comunicações em painel

Mélissa Lopes, Soraia Falcão, Miguel Vilas-Boas. Qualidade do Mel da Guiné- Bissau. III Congresso Ibérico de Apicultura, 13 a 15 de Abril, 2014, Mirandela, Portugal.

Comunicações orais

Mélissa Lopes, Soraia Falcão, Maria Dimou, Andreas Thrasyvoulou, Miguel Vilas-Boas. Avaliação da qualidade do mel da Guiné- Bissau. II Encontro dos Jovens Investigadores, 12 a 14 de Novembro, 2014, Bragança, Portugal.

Tabela 13- Análise melissopalínológica.

Tipo de pólen/ amostra	Família	Nome comum	Bambadinca	Bula	Pirada	Sonaco	Contubel	Pitche	Bafatá 02	Bafatá 03	Gabú 01	Gabú 02	Gabú 03
<i>Acacia spp.</i>	Fabaceae	Acácia	-	-	-	0,3%	0,2%	-	0,2%	-	-	-	-
<i>Adansonia digitata</i>	Bombacaceae	Cabaceira	-	-	0,1%	0,6%	0,2%	-	0,2%	-	-	0,1%	-
<i>Allophyllus africanus</i>	Sapindaceae	Groselha falsa africana	-	-	-	-	-	-	2,8%	-	-	-	-
<i>Alstonia congensis</i>	Apocynaceae	Pau de tagara	-	-	-	-	0,2%	-	0,2%	-	1,2%	-	0,6%
<i>Alternanthera repens</i>	Amaranthaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1%	-
<i>Amaranthaceae/Chenopodiaceae</i>	Amaranthaceae	-	-	-	-	-	-	-	0,2%	-	-	-	-
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	Cajueiro	-	-	-	-	-	0,3%	-	-	14,3%	-	0,3%
<i>Avicennia germinans</i>	Acanthaceae	Tarafe	-	9,5%	-	-	0,4%	-	-	0,7%	-	0,3%	1,7%
<i>Cassia sieberiana</i>	Fabaceae	canafistra	-	38,1%	1,5%	16,0%	9,1%	11,1%	-	15,2%	-	11,4%	37,5%
<i>Ceiba pentandra</i>	Malvaceae	Poilon	-	-	0,5%	0,3%	1,5%	0,3%	-	-	1,2%	1,0%	2,5%
Corylaceae type	Corylaceae/Betulaceae	ex:avelã	-	-	-	-	7,6%	-	-	-	-	-	-
<i>Crinum spp.</i>	Amarylidaceae	Lírio	-	9,5%	-	12,7%	1,3%	4,9%	4,6%	43,7%	-	6,9%	8,3%
Cyperaceae	Cyperaceae	-	-	-	0,2%	-	-	0,3%	6,5%	-	-	-	-
<i>Diospyros type</i>	Ebenaceae	Tipo diospiro	-	-	-	-	-	-	2,4%	-	-	-	-
<i>Elaeis guineensis</i>	Arecaceae	Palmeira	-	14,3%	0,5%	0,6%	2,1%	2,1%	0,9%	2,6%	28,6%	5,5%	21,4%
<i>Ficus type</i>	Moraceae	Tipo figo	-	-	-	-	-	-	2,8%	-	-	-	-
<i>Iodes type</i>	Icacinaceae	-	-	9,5%	0,1%	0,3%	0,4%	0,3%	0,4%	-	-	0,6%	0,6%
<i>Khaya type</i>	Meliaceae	Bissilau	-	-	-	-	-	-	0,2%	0,7%	1,2%	0,3%	0,6%

Tipo de pólen/ amostra	Família	Nome comum	Bambadinca	Bula	Pirada	Sonaco	Contubel	Pitche	Bafatá 02	Bafatá 03	Gabú 01	Gabú 02	Gabú 03
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	Mangueira	-	-	4,2%	0,6%	0,8%	1,3%	5,0%	-	-	0,3%	-
<i>Mimosa spp.</i>	Fabaceae	Mimosa	-	-	-	-	-	-	1,1%	-	-	-	-
<i>Morus type</i>	Moraceae	Tipo amora	89,3%	-	-	-	-	-	1,1%	9,9%	11,9%	-	-
<i>Musa spp.</i>	Musaceae	Bananeira	-	-	-	0,3%	0,2%	0,3%	-	-	-	0,1%	0,6%
<i>Parkia biglosa</i>	Fabaceae	Farroba	-	-	0,7%	1,2%	0,6%	0,3%	1,3%	6,6%	-	0,6%	0,3%
<i>Piliostigma reticulatum</i>	Fabaceae	-	-	-	0,5%	-	0,6%	-	-	-	-	0,3%	-
<i>Poaceae</i>	Poaceae	-	-	-	0,2%	-	-	-	11,3%	-	-	0,3%	-
<i>Prosopis tamarindum</i>	Fabaceae	Tamarindu	-	-	2,7%	1,5%	0,8%	0,5%	-	-	-	0,9%	1,1%
<i>Pterocarpus erinagens</i>	Fabaceae	Pau de sangue	-	-	-	0,3%	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizophora spp.</i>	Rhizophoraceae	Tarafe	1,9%	4,8%	42,7%	33,1%	29,9%	37,0%	39,7%	14,6%	23,8%	27,8%	3,6%
<i>Sesamum type</i>	Pedaliaceae	Tipo sésamo	-	-	-	0,3%	-	0,3%	-	-	-	-	-
<i>Syzygium spp.</i>	Myrtaceae	-	-	-	-	2,7%	-	-	-	-	-	-	-
<i>Terminalia macroptera</i>	Combretaceae	Macete	2,9%	9,5%	38,2%	16,3%	35,2%	34,2%	11,7%	0,7%	6,0%	37,5%	11,4%
<i>Uvariopsis congensis</i>	Annaraceae	-	-	-	0,1%	0,3%	-	-	-	-	-	-	-
Unidentified			5,8%	4,8%	7,6%	12,7%	8,8%	7,0%	7,4%	5,3%	11,9%	6,1%	9,7%

Qualidade do Mel da Guiné- Bissau

Mélissa Lopes, Soraia Falcão, Miguel Vilas-Boas*

CIMO - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta.
Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal;

* mvboas@ipb.pt

O mel é uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas a partir do néctar de flores, de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas sobre as partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam no favo de mel para amadurecer. [1]

A origem botânica e geográfica do mel é uma questão importante em termos de qualidade e segurança alimentar e reflete-se na composição química do mel. [2] Neste projeto pretende-se efetuar o primeiro estudo sobre a avaliação da qualidade de mel proveniente da região leste da Guiné- Bissau, um país subdesenvolvido situado na Costa Ocidental de África, onde a apicultura tem como principal função promover o desenvolvimento rural mas também contribuir para a melhoria das condições nutricionais da população. A aplicação de novas tecnologias de produção que garantam a segurança dos alimentos e a obtenção de produtos de qualidade, em particular o mel, é um passo basilar no seu desenvolvimento. Os trabalhos decorrem em 11 amostras recolhidas em seis diferentes regiões nos anos de 2010 a 2013.

O estudo é efetuado segundo os métodos de análise de parâmetros físico-químicos definidos pela comissão internacional do mel, IHC (Harmonised Methods of the International Honey Commission). Os parâmetros de qualidade avaliados são a cor, a humidade, condutividade elétrica, pH, acidez livre, lactonas e acidez total, teor em hidroximetilfurfural e índice diastásico.

Os resultados evidenciaram um mel com uma predominância cromática de âmbar escuro, com teores de humidade compreendidos entre 16% e 20%. Para a condutividade elétrica os valores apresentaram uma elevada variabilidade entre os 336 e aos 856 μscm^{-1} ,

verificando-se que algumas amostras excedem os valores referenciados no codex para a qualidade do mel de néctar. Os teores em HMF (hidroximetilfurfural, um dos parâmetros mais significativos na avaliação da qualidade do mel), apresentaram também uma elevada oscilação, atingindo mesmo uma das amostras um valor acima de 80 mgkg^{-1} , o valor máximo recomendado para o mel de regiões tropicais). Os resultados para a acidez livre determinada no ponto de equivalência variou entre os 16 e 45 meqkg^{-1} , enquanto a determinação a pH 8,3 os valores subiram para 22 a 61 meqkg^{-1} . Estes valores elevados, associados ao elevado teor em HMF sugerem que algumas das amostras apresentam já um estado significativo de fermentação, recomendando-se por isso uma melhoria nas condições de produção de mel, para que se possa atingir os padrões de qualidade internacionais.

[1] Codex Alimentarius Committee on Sugars. Codex standard 12, Revised Codex Standard for Honey. Standards and Standard Methods, 11, 1-7, 2011.

[2] Jun Wang, Qing Li X., Advances in Food and Nutrition Research, 62, 89-137, 2011.



Figura 16- Comunicação em painel, III Congresso Ibérico de Apicultura.

Avaliação da qualidade do mel da Guiné-Bissau

Mélissa Lopes¹, Soraia Falcão¹, Maria Dimou², Andreas Thrasyvoulou², Miguel Vilas-Boas¹

¹CIMO - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Sta. Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal;

²Laboratory of Apiculture & Sericulture, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

Nos países subdesenvolvidos a apicultura é uma fonte de alimento que contribui para melhorar as condições nutricionais da população e simultaneamente é uma fonte de rendimento com relevância nas áreas rurais. Este projeto pretende efetuar o primeiro estudo de avaliação da qualidade de mel proveniente da Guiné- Bissau.

A avaliação dos parâmetros de qualidade foi realizada por aplicação das metodologias analíticas definidas pela IHC. Os resultados evidenciam um mel com uma predominância cromática âmbar escuro, com teores de humidade entre 16% e 20%, e uma condutividade variável entre 336 e 856 μscm^{-1} . Os teores em hidroximetilfurfural apresentam valores significativamente altos. Os resultados para a acidez livre, oscilam entre os 16 e 45 meqkg^{-1} . Para a diastase os valores encontram-se entre os 9 e 27 DN, e para a prolina oscilam entre os 0,29 mg/g e os 1,18 mg/g. A análise da matéria insolúvel revelou valores significativos até um máximo de 0,33%. A análise de açúcares, efetuada por HPLC/RI, permitiu identificar a presença dos monossacáridos frutose, glucose, e dos dissacarídeos turanose, maltulose, maltose e trealose.

Para além dos parâmetros físico-químicos, as amostras de mel foram avaliadas no teor em compostos fenólicos (0,85-0,25 mgGAEkg^{-1}) e na sua atividade antioxidante através do teste de DPPH (valores de EC_{50} oscilaram entre 10 e 61 mgmL^{-1}) e poder redutor (0,6- 3 mgGAEg^{-1}). A origem floral do mel foi obtida através da análise melissopalínológica, revelando a presença de um grande número de grãos de pólen e elevada diversidade, dominando o pólen de *Rhizophora spp.* e *Terminalia macroptera*.

Palavras- chave: Mel, propriedades físico-químicas, atividade antioxidante, análise polínica.