

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE MEIS COMERCIAIS

Susana Paula Martins Gomes

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

Orientado por

Prof^a Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Eng. Paula Cristina Azevedo Rodrigues

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

**Bragança
2009**

Agradecimentos

De maneira humilde gostaria de agradecer a várias pessoas, que de alguma forma contribuíram para que esta tese se concretizasse.

Ao Professor Doutor Luís Dias, por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e acompanhamento ao longo deste trabalho.

A todas as funcionárias e colegas do Laboratório de Microbiologia, e aos que vão passando, pela boa disposição e pelo bom ambiente de trabalho proporcionado.

Aos amigos, Sofia, Ercílio, Miguel, Marco e Zé agradeço todo o incentivo, conselhos, apoio incondicional e companheirismo nos bons e nos maus momentos. Obrigado pelos bons momentos passados, que ajudavam a superar o trabalho e ficarão guardados na memória.

Aos meus padrinhos pelo apoio e incentivo e total disponibilidade.

À minha família, mãe, pai e irmãs, pelo apoio e incentivo e ajuda nas horas mais difíceis.

Índice

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
CAPÍTULO I - <i>Introdução</i>	1
1.1. BREVE INTRODUÇÃO	2
1.2. OBJECTIVOS.....	3
1.3. BREVE INTRODUÇÃO HISTÓRICA	4
1.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL.....	7
1.4.1. Aroma e sabor	7
1.4.2. Humidade e Actividade da Água.....	7
1.4.3. Índice Diastásico e Hidroximilturfural	8
1.4.4. Compostos Fenólicos e Flavonóides	8
1.4.5. Hidratos de Carbono.....	9
1.4.6. Acidez livre e pH.....	9
1.4.7. Cinzas	9
1.4.8. Condutividade Eléctrica	10
1.5. CLASSIFICAÇÃO DO MEL	5
1.6. ECOLOGIA MICROBIANA.....	11
1.7. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	13
1.8. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	15
CAPÍTULO II - <i>Material e Métodos</i>	16
2.1. AMOSTRA DE MEL.....	17
2.2. CARACTERIZAÇÃO POLÍNICA.....	17
2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEL.....	18
2.3.1. Humidade	18
2.3.2. Condutividade Eléctrica	18
2.3.3. Cinzas Totais	18
2.3.4. pH.....	18
2.3.5. Acidez Livre	19
2.3.6. Açúcares Redutores.....	19

2.3.7. Sacarose Aparente	20
2.3.8. Hidroximetilfurfural (HMF).....	20
2.3.9. Índice Diastásico	21
2.3.10. Actividade da Água.....	21
2.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	22
2.4.1. Quantificação de microrganismos mesófilos	22
2.4.2. Quantificação de bactérias sulfito-redutoras	22
2.4.3. Quantificação de leveduras osmófilas e bolores xerófilos viáveis	23
2.4.4. Quantificação de coliformes fecais pelo método da estimativa do número mais provável.....	23
2.4.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. por meios selectivos e diferenciais.....	24
2.5. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA	25
2.5.1. Preparação do Mel.....	25
2.5.2. Microrganismos e Condições de Cultura	25
2.5.3. Método	25
2.5.4. Cálculo das Taxas Específicas de Crescimento.....	26
2.6. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	27
2.7. COMPOSTOS BIOACTIVOS.....	28
2.7.1 Compostos Fenólicos totais.....	28
2.7.2. Flavonóides	28
CAPÍTULO III - Resultados e Discussão	29
3.1. ANÁLISE POLÍNICA	30
3.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	31
3.3. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO MEL	34
3.4. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
3.5. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	36
3.6. COMPOSTOS BIOACTIVOS DO MEL.....	37
3.6.1. Flavonóides e Compostos Fenólicos Totais	38
CAPÍTULO IV - Considerações Finais	39
CAPÍTULO V - Referências Bibliográficas	41
Anexos.....	54

RESUMO

Nos últimos anos, devido à melhoria dos padrões de vida e ao interesse crescente por produtos naturais com efeitos benéficos para a saúde, tem-se verificado um aumento do consumo de mel. O mel tem-se destacado na indústria dos produtos naturais pelas suas propriedades terapêuticas como actividade antioxidante e antimicrobiana, e também pela aplicação nas indústrias alimentar e de cosméticos.

Neste trabalho avaliaram-se as características físico-químicas, melissopalínológicas e segurança microbiológica, bem como algumas propriedades bioactivas de 5 méis comerciais, adquiridos no mercado local.

Efectuaram-se várias análises físico-químicas aos méis estudados, sendo ela, humidade, condutividade eléctrica, cinzas totais, pH, acidez livre, açúcares redutores, sacarose aparente, hidroximetilfurfural (HMF), índice diastásico e actividade da água. Os resultados obtidos foram, no geral, satisfatórios uma vez que, praticamente todas as amostras apresentaram valores dentro do permitido por lei para os vários parâmetros analisados.

Dos cinco méis estudados, 4 eram monoflorais e num deles a quantidade de pólen era muito reduzida, não permitindo a sua quantificação.

No que diz respeito à actividade anti-fúngica, verificou-se que os diferentes tipos de mel não diferiram na capacidade de limitar o desenvolvimento de várias leveduras em estudo. Relativamente à resistência das leveduras aos diferentes méis, *Zigosaccharomyces mellis* ESA38 e *Zigosaccharomyces rouxii* ESA56 não foram influenciadas pela presença de mel no meio extracelular (concentrações até 50%). *Saccharomyces cerevisiae* ESA1 e *Zigosaccharomyces bailii* ISA 1307 evidenciaram uma ligeira sensibilidade.

Palavras-chave: mel, análise polínica, caracterização físico-química, flavonóides, compostos fenólicos totais, actividade antioxidante, actividade antimicrobiana

ABSTRACT

In recent years, due to improved living standards and the growing interest in natural products with beneficial effects on health, there has been a raise in honey consumption. Honey has been standing out in the natural products industry for its therapeutic properties as an antioxidant and antimicrobial activity, and also the application in the food and cosmetics.

In this study there were evaluated the physico-chemical and melissopalinalogical characteristics and microbiological safety, as well as some bioactive properties of 5 commercial honeys, got in a local market.

There have been several physical and chemical analysis of honeys studied with her, moisture, electrical conductivity, total ash, pH, free acidity, reducing sugars, apparent sucrose, hydroxymethylfurfural content (HMF), diastase activity and water activity. The results were in general satisfactory, since virtually all samples showed the extent permitted by law for the various parameters. The results were in general satisfactory, since virtually all samples showed values permitted by law for the various analyzed parameters.

Of the five honeys studied, 4 were monofloral and in one of them the amount of pollen was very low, not allowing it quantification.

Concerning to the anti-fungal activity, it was found that the different types of honey did not differ in ability to limit the development of several studied yeasts. Regarding the resistance of yeasts to different honeys, *Zigosaccharomyces mellis* ESA38 and *Zigosaccharomyces rouxii* ESA56 were not influenced by the presence of honey in the extracellular environment (concentrations up to 50%). *Saccharomyces cerevisiae* ESA1 and *Zigosaccharomyces bailii* ISA 1307 showed a slight sensitivity.

Keywords: honey, pollen analysis, physicochemical characterization, flavonoids, total phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1- Composição básica do mel	5
Tabela 2 – Predominância de pólen e cores dos 5 méis analisados	31
Tabela 3- Parâmetros físico-químicos das amostras de mel	32
Tabela 4 – Coeficientes de correlação entre os parâmetros físico-químicos das amostras de méis comerciais analisados	35
Tabela 5 – Análise Microbiológica das amostras de mel	36
Tabela 6 – Actividade antimicrobiana dos diferentes méis contra quatro leveduras de fermentação	37
Tabela 7- Valores de EC ₅₀ (mg/mL) das amostras de mel analisadas	38
Tabela 8- Flavonóides e Compostos Fenólicos totais dos méis comerciais	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Valores do poder redutor obtidos para os diferentes méis analisados	38
--	----



CAPÍTULO I

Introdução

1.1. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

O mel é uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insectos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia (Decreto-Lei nº 214/2003).

O mel é constituído essencialmente por açúcares, frutose (38%) e glucose (50%), além de outras substâncias tais como ácidos orgânicos, enzimas (UE, 2001) e partículas sólidas, principalmente pólen, vestígios de cera e quantidades variáveis de leveduras osmofílicas (Downey *et al.*, 2005).

Devido à sua doçura e valor nutritivo, o mel tem sido um alimento altamente valorizado desde os primórdios da humanidade (Downey *et al.*, 2005; Pisani *et al.*, 2008). O mel tem sido relatado por ser eficaz em doenças gastrointestinais, na cicatrização de feridas e queimaduras, como um agente anti-microbiano e por fornecer protecção gástrica contra lesões agudas e crónicas gástricas (Al-Mamary *et al.*, 2002).

Nos últimos anos devido à melhoria dos padrões de vida e ao interesse crescente por produtos naturais com efeitos benéficos para a saúde, tem-se verificado um aumento do consumo de mel, sobretudo nos países industrializados.

Com este trabalho pretendemos contribuir para beneficiar o sector Apícola, especialmente dando visibilidade e resposta às questões da Segurança Alimentar, tranquilizando o cliente final e verificando o cumprimento da legislação, diminuindo assim o risco de colocação no mercado produtos nocivos para a Saúde Pública.

1.2. OBJECTIVOS

Este trabalho tem como objectivo global caracterizar e avaliar as propriedades bioactivas de méis comerciais.

Enquanto objectivos específicos deste trabalho pretende-se:

- Avaliar a origem floral através da análise melissopalinológica
- Caracterizar a composição físico-química
- Avaliar a microbiota
- Avaliar a actividade antimicrobiana
- Quantificar os fenóis totais e flavonóides
- Estudar a actividade antioxidante

1.3. BREVE INTRODUÇÃO HISTÓRICA

O mel, a que os Gregos e Romanos chamavam “ambrósia”, era considerado um “alimento digno de Deuses”. Na mitologia grega, o jovem Zeus, salvo de seu pai, Cronos, foi criado em segredo pelas ninfas Adresteia, Amalteia e Melissa e alimentado com leite e mel. Muito antes de ter sido introduzida a apicultura, o homem da Idade da Pedra aprendera a apreciar o mel das abelhas selvagens, e na Antiguidade, os Egípcios, Persas e Chineses reconheciam-lhe o valor. Com mel fermentado e água, os celtas e os Anglo-Saxões preparavam o hidromel, a sua bebida revigorante. O rei Salomão recomendava-o, e a Bíblia refere-se a terras onde corria o leite e o mel. Na Europa, até meados do século XVII, o mel era o adoçante do povo, estando o açúcar reservado à nobreza e ao clero. De acordo com as contas da ucharia do rei D. Dinis de Portugal, o preço do açúcar era cerca de 50 vezes superior ao do mel (Whirter e Clasen, 1997).

O mel é usado como alimento pelo homem desde a pré-história, por vários séculos foi retirado dos enxames de forma extrativista e predatória, muitas vezes causando danos ao meio ambiente, matando as abelhas. Entretanto, com o tempo, o homem foi aprendendo a proteger os seus enxames, instalá-los em colmeias racionais e manejá-los de forma que houvesse maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas. Assim surgiu a apicultura.

Hoje, com a criação racional das abelhas, além do mel, é possível explorar produtos como o pólen apícola, geleia real, rainhas, polinização, apitoxina e cera. Para isso, é necessário que o produtor possua conhecimentos sobre biologia das abelhas, técnicas de manejo da colmeia, pragas e doenças dos enxames, importância económica, mercado e comercialização.

1.4. CLASSIFICAÇÃO DO MEL

O levantamento palinológico quantitativo e qualitativo de uma amostra de mel constitui o seu espectro polínico (obtido por análise polínica da amostra). Este espectro diz respeito às plantas produtoras de néctar, às não produtoras, às contaminações, falsificação e mistura (Downey *et al.*, 2005)

A contagem e identificação dos polens permite (Finola *et al.*, 2007):

- Identificar as plantas visitadas pelas abelhas na recolha do néctar possibilitando, desta forma, o reconhecimento sobre a origem geográfica dos méis.
- Verificar a veracidade da origem floral declarada nas embalagens
- Diferenciar méis monoflorais de méis multiflorais.

A comparação da composição entre um mel desconhecido com méis padrão pode permitir a identificação. Alguns méis monoflorais têm propriedades químicas ou físicas específicas, que podem ser utilizadas para confirmar os resultados da análise microscópica, como o antranilato de metilo, hesperetina e os flavonóides. Estes são indicadores de mel de citrinos e o “norisoprenoid” e “S-dehydrovomifoliol” indicadores de mel de urze. Os méis claros têm uma alta condutividade eléctrica e contêm muita melezitose (Terrab *et al.*, 2004).

Um mel é considerado monofloral, se é produzido principalmente a partir de uma espécie de planta, e se o pólen predominante está presente numa proporção igual ou superior a 45% (Sancho, 1992). No entanto, há casos em que a percentagem referida não é válida, pois pode-se verificar uma subrepresentação de pólen. De facto, há flores pobres em néctar ou que não permitem um bom contacto de abelha com o pólen. Como exemplos temos os méis de *Citrus* sp., *Lavandula* sp., *Rosmarinus* sp. (Maia *et al.*, 2003).

Podem também ocorrer casos de sobrerepresentação de pólen, como por exemplo méis de *Castanea sativa* Miller, em que estes méis só são considerados monoflorais se apresentarem uma percentagem de pólen igual ou superior a 90% (Andrade, 1996).

No caso de não existir pólen predominante num mel, este é considerado multifloral.

As frequências relativas de pólen (FR) resultam da contagem de pelo menos 1200 grãos de pólen e são apresentadas do seguinte modo (Louveaux *et al.*, 1958):

- “Muito frequente” para grãos de pólen que constituem mais de 45% do total;
- “Frequente” para grãos de pólen que constituem 16-45% do total;
- “Raro” para grãos de pólen que constituem 3-15% do total;
- “Esporádico” para grãos de pólen que constituam 1-3% do total;
- “Presente” para grãos de pólen que constituem menos de 1% do total.

1.5. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL

O mel é uma solução super saturada de açúcar que contém mais de 180 outros constituintes como enzimas, aminoácidos e ácidos orgânicos, carotenóides, produtos de reação de Maillard, vitaminas, minerais e polifenóis (Azeredo *et al.*, 2003; Downey *et al.*, 2005; Küçük *et al.*, 2007), e antioxidantes não enzimáticos, incluindo catalase, ácido ascórbico e carotenóides (Aljadi e Kamaruddin, 2004; Batrušaitytė *et al.*, 2007). Os compostos secundários (Al-Mamary *et al.*, 2002) são os responsáveis pelas propriedades bioactivas do mel, nomeadamente os compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), proteínas, sais minerais, vitaminas e lípidos (Beretta *et al.*, 2005).

1.5.1. Aroma e sabor

O aroma e o sabor do mel devem-se fundamentalmente a componentes de baixo peso molecular, que provêm das plantas de origem. O aroma e sabor de cada mel variam ainda mais do que a cor, já que no sabor e aroma do mel intervêm compostos resultantes da reacção entre açúcares, aminoácidos e ácidos (reacções de Maillard- acastanhamento enzimático), taninos e compostos glucosídicos (Bertoncelj *et al.*, 2007).

1.5.2. Humidade e Actividade da Água

O conteúdo de água é um parâmetro de qualidade muito importante em todos os produtos alimentares, tendo uma elevada influência na qualidade e, principalmente, na vida útil dos alimentos. O teor de humidade é um dos principais parâmetros de análise da qualidade do mel, não sendo tolerados valores acima de 20% para o mel puro, devido à facilidade de desenvolvimento de certos microrganismos responsáveis pela fermentação (EU, 2001; Bera e Almeida-Muradian, 2007). O conteúdo de água do mel depende de vários factores, como por exemplo, da época de colheita, do grau de maturação alcançado na colmeia e de factores climáticos (Finola *et al.*, 2007). Este parâmetro vai influenciar uma das propriedades físicas do mel, a viscosidade (Olaitan *et al.*, 2007).

Ao descrever o teor em água é necessário referir a actividade de água (a_w). Esta está mais relacionada com problemas de qualidade (estabilidade, viscosidade e cristalização do mel). Os métodos oficiais de quantificação do teor de água livre baseiam-se em medidas refractométricas. Têm sido efectuados vários estudos com o

objectivo de estabelecer modelos que permitam correlacionar o teor de água com a actividade de água (Abramovic *et al.*, 2008).

1.5.3. Índice Diastásico e Hidroximetilfurfural

A actividade diastásica e o hidroximetilfurfural (HMF) são indicadores da qualidade do mel, nomeadamente da sua frescura (Küçük *et al.*, 2007). Estão relacionados com o tempo de armazenamento e/ou aquecimento excessivo do mel.

A actividade diastásica está intimamente relacionada com a estrutura do mel e pode ser modificada por desnaturação, feita por aquecimento, não sendo um parâmetro adequado para detectar a origem do mel (Tosi *et al.*, 2008).

O HMF pode ser formado pela desidratação da hexose em meio ácido ou pelas reacções de Maillard. Um mel de elevada qualidade deverá ter um teor de HMF baixo e um Índice Diastásico elevado (Tosi *et al.*, 2008).

1.5.4. Compostos Fenólicos e Flavonóides

O mel é um produto alimentar rico quer em antioxidantes enzimáticos (glucose oxidase e catalase) quer não enzimáticos (ácido ascórbico, flavonóides, ácidos fenólicos, derivados de carotenóides, ácidos orgânicos, produtos das reacções de Maillard, aminoácidos e proteínas) (Meda *et al.*, 2005; Baltrušaitytė *et al.*, 2007). Os compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonóides do mel, são considerados potenciais marcadores da origem botânica do mel.

O conteúdo de compostos fenólicos totais dos recursos naturais, como vegetais e mel, reflectem, em certa medida, a capacidade antioxidante total da amostra (Beretta *et al.*, 2005).

Em relação aos ácidos fenólicos, os dominantes são os ácidos gálico e p-cumárico, sendo os ácidos caféico, ferúlico, elágico e clorogénico, siríngico e vanílico e p-hidroxibenzóico constituintes minoritários (Estevinho *et al.*, 2008).

Muitos investigadores verificaram que os méis de cor escura apresentam um teor em compostos fenólicos superior e conseqüentemente, uma maior actividade antioxidante (Taormina *et al.*, 2001; Estevinho *et al.*, 2008; Al *et al.*, 2009). A cor escura reflecte, em parte, o conteúdo em pigmentos muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes (Taormina *et al.*, 2001).

1.5.5. Hidratos de Carbono

A glucose (30,3%), a frutose (41,1%) e a sacarose (1,3%) são os constituintes maioritários do mel. O teor mínimo permitido pela legislação portuguesa para os açúcares redutores é 60g/100g, excepto para o mel de citrinos. A proporção de frutose/glucose influencia o sabor e a cristalização do mel (Finola *et al.*, 2007)

Um elevado teor de sacarose no mel pode significar uma adulteração do mel (presença de melada ou alimentação artificial das abelhas) ou ainda uma recolha prematura, já que a sacarose ainda não foi totalmente dissociada em glucose e frutose, pela acção de enzimas (Küçük *et al.*, 2007). O valor máximo permitido para este parâmetro no mel é 5%, podendo existir excepções para alguns tipos de mel.

1.5.6. Acidez livre e pH

A acidez do mel tem origem nos ácidos orgânicos, provenientes do néctar, da acção da glucose oxidase, que forma o ácido glucónico e da acção de bactérias durante a maturação do mel. Deste modo, os méis multiflorais apresentam valores de acidez inferiores (Küçük *et al.*, 2007). Os valores de acidez devem ser inferiores a 50 meq.Ac/kg.

O pH do mel varia entre 3,4 e 6,1 com um valor médio de 3,9 (Iurlina e Fritz, 2005), no entanto, este parâmetro não está directamente relacionado com a acidez livre devido à acção tampão dos ácidos e minerais presentes no mel (Pereira *et al.*, 2009).

Estudos efectuados por Finola *et al.* (2007) demonstram uma relação inversa entre a acidez livre e o teor de cinzas do mel. Estes autores explicam esta relação considerando que um teor de minerais superior corresponde a uma fracção de ácidos salinizados presentes. No entanto, as correlações variam de méis para méis.

Este parâmetro está ainda relacionado com a quantidade de minerais presentes no mel.

1.5.7. Cinzas

O mel apresenta normalmente, um baixo teor de cinzas, o qual depende do material recolhido pelas abelhas durante a recolha de néctar e melada (Rodríguez *et al.*,

2004). Os valores obtidos para este parâmetro expressam a presença quantitativa de minerais no mel (Finola *et al.*, 2007). Os méis de cor escura têm, geralmente um teor de cinzas mais elevado que os méis de cor clara (Finola *et al.*, 2007).

1.5.8. Condutividade Eléctrica

A condutividade eléctrica, está relacionada com a origem floral pois e deste modo com as espécies florais predominantes no mel. Depende também da concentração de sais minerais, ácidos orgânicos e proteínas presentes no mel (Acquarone *et al.*, 2007). Segundo Acquarone *et al.*, (2007) existe uma correlação linear entre o teor de cinzas e condutividade eléctrica.

1.6. ECOLOGIA MICROBIANA

As propriedades intrínsecas do mel (particularmente o pH baixo, humidade e actividade da água (aw) baixas, elevada viscosidade, concentração elevada de açúcares e pressão osmótica altas) são pouco propícias ao crescimento microbiano, embora permitam a sobrevivência de alguns microrganismos.

O mel tem uma microflora própria, introduzida pelas abelhas, nomeadamente, esporos bacterianos, bolores e leveduras (Olaitan *et al.*, 2007). Para além da microbiota original, outros microrganismos podem ser introduzidos neste produto alimentar por fontes secundárias de contaminação tais como manipulação, local da recolha, equipamento, roedores e outros animais.

Entre os microrganismos patogénicos para a abelha, que podem passar para o mel, salientam-se *Bacillus larvae*, *Bacillus alvei*, *Aspergillus flavus*, *Ascosphaera apis*, *Ascosphaera alvei* (Snowdon e Cliver, 1996), *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*. As leveduras osmofílicas (capazes de crescer a elevadas concentrações de açúcar), são frequentemente isoladas da colmeia, provenientes da cera, do néctar e das abelhas mortas.

Segundo Mungoi (2008) o mel é um alimento seguro no que diz respeito aos perigos sanitários comuns associados aos alimentos tradicionais, no entanto, pode alterar-se se ocorrerem anomalias durante o processamento, embalagem e conservação.

Os principais grupos de bactérias em méis maduros são *Gluconobacter* e *Lactobacillus*. Estes microrganismos apenas sobrevivem no mel com teores de humidade superiores a 18%.

No mel já foram isoladas *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (Finola *et al.*, 2007).

O consumo de mel contendo esporos de *C. botulinum* é especialmente perigoso para bebés e crianças, pois na ausência de uma flora intestinal competitiva e sendo o pH do seu intestino elevado, os esporos podem germinar no intestino, e formar a toxina *in situ*, provocando o botulismo infantil. Por este motivo, apesar da baixa incidência destes microrganismos no mel, as autoridades recomendam que este produto não seja utilizado na alimentação de crianças com menos de um ano de idade. Estas bactérias podem ser também problemáticas em indivíduos imunodeprimidos, e quando o mel é aplicado terapêuticamente em feridas.

Em méis granulados e com elevados teores de humidade (maior que 21%), de cinzas e de compostos azotados, podem ocorrer fermentações conduzidas por leveduras, tornando o produto impróprio para consumo. A concentração de leveduras é proporcional à disponibilidade da água. O género *Saccharomyces* é o mais frequente no mel. Foram também isoladas leveduras pertencentes às espécies *Zygosaccharomyces rouxii*, *Hansenula subpelliculosa*, *Saccharomyces norbensis*, *Kluyveromyces vanudenii* e *Endomycopsis burtonii* (Bahiru *et al.*, 2006)

Nestes méis podem também, ser encontrados microrganismos patogénicos, indicando contaminação recente por uma fonte secundária.

1.7. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

O mel é utilizado como medicamento há milhares de anos no tratamento de doenças respiratórias, infecções gastrointestinais, queimaduras e feridas. As suas características físicas e químicas conferem-lhe propriedades únicas como agente antimicrobiano efectivo.

Muitos investigadores têm desenvolvido estudos sobre a actividade antimicrobiana do mel, nomeadamente, contra bactérias patogénicas resistentes a antibióticos, contra bactérias patogénicas envolvidas em algumas doenças, contra bactérias alimentares patogénicas e contra bactérias responsáveis pela deterioração de alimentos.

As bactérias exibem diferente sensibilidade ao mel. Algumas, como *Staphylococcus aureus* (Estevinho *et al.*, 2008), *Staphylococcus epidermidis* (Basualdo *et al.*, 2007), *Bacillus stearothermophilus* (Mundo *et al.*, 2004) são muito sensíveis, enquanto outras, *Staphylococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Basualdo *et al.*, 2007), *Bacillus cereus* (Taormina *et al.*, 2001), *Alcaligenes faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* (Mundo *et al.*, 2004), *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis* (Küçük *et al.*, 2007) apenas o são moderadamente. Por outro lado, o crescimento de *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* (Basualdo *et al.*, 2007) e *Pseudomonas aeruginosa* (Estevinho *et al.*, 2008) parece não ser afectado pelo mel.

A informação disponível sobre a capacidade do mel para inibir o crescimento de leveduras é limitada, não sendo do nosso conhecimento a existência de estudos sobre a actividade em leveduras fermentativas, que podem representar um problema comum em méis com elevados teores de humidade (> 20%). Foram, no entanto, publicados alguns estudos sobre a actividade antifúngica do mel, particularmente contra isolados clínicos de *Candida* sp. (Irish *et al.*, 2006; Küçük *et al.*, 2007).

São inúmeras as características do mel que contribuem para a sua actividade antibacteriana. A reacção enzimática de oxidação da glucose e algumas das suas propriedades físicas são considerados os factores principais. Outros factores incluem:

- Pressão osmótica alta;
- Baixa actividade da água;
- Baixo pH/ambiente ácido;
- Baixo conteúdo em proteínas;

- Relação C/N alta;
- Baixo potencial redox devido ao elevado teor em açúcares redutores.

A glucose oxidase é uma enzima segregada pelas abelhas que transformam o néctar em mel. Na presença de água e oxigénio converte a glucose em ácido glucónico e peróxido de hidrogénio. A acidez resultante e o peróxido de hidrogénio inibem o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos no mel durante o processo de amadurecimento (Weston, 2000).

A actividade antimicrobiana do mel depende da origem floral e do processamento já que estes factores condicionam a produção de peróxido de hidrogénio e de factores não peróxido. A presença de iões metálicos, de ácido ascórbico e de catalase provenientes do néctar podem destruir o peróxido de hidrogénio, reduzindo desta forma a sua propriedade antimicrobiana (Al-Mamary *et al.*, 2002).

As propriedades antimicrobianas devem-se também a outros factores claramente menos definidos, tais como pinocembrin (um componente antibacteriano do mel), lisozima, terpenos e álcool benzílico e substâncias voláteis (fitoquímicos) (Snowdon e Cliver, 1996).

1.8. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Nos últimos anos tem-se assistido a uma intensa procura de produtos naturais com propriedades antioxidantes.

Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, e quando comparadas com o substrato oxidável, atrasam significativamente ou previnem a oxidação desse mesmo substrato (Al-Mamary *et al.*, 2002).

Estas substâncias contribuem para a prevenção de doenças associadas ao envelhecimento, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares e o aparecimento de cancro (Serra, sem data).

Os antioxidantes actuam, também, como conservantes alimentares incluindo reacções de oxidação responsáveis pela degradação de alimentos.

O mel não é apenas um alimento de alto valor nutritivo, apresenta também compostos que lhe conferem propriedades antioxidantes, tais como os polifenóis e os flavonóides. Alguns destes compostos já foram identificados no mel, nomeadamente, os ácidos cinâmico, caféico, ferúlico e cumárico, a quercetina, crisina e canferol (Tomás-Barberan *et al.*, 2001).

Actualmente têm sido publicados inúmeros estudos sobre a avaliação da actividade antioxidante do mel (Estevinho *et al.*, 2008), a qual está correlacionada positivamente com o conteúdo em compostos fenólicos e conseqüentemente com a sua origem botânica. De facto, verificou-se uma forte correlação entre a actividade antioxidante e a cor do mel. Constatou-se que os méis de cor escura apresentavam um teor em compostos fenólicos maior e, conseqüentemente uma actividade antioxidante mais elevada (Estevinho *et al.*, 2008). A cor escura reflecte, parcialmente, o conteúdo em pigmentos como os carotenóides e flavonóides, muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes.

A avaliação da actividade antioxidante no mel pode contribuir para a valorização económica do produto em virtude do seu uso tradicional como adoçante poder constituir uma alternativa mais saudável. A existência desta propriedade pode ainda favorecer a utilização do mel como conservante alimentar, sendo já conhecida a sua acção inibitória sobre a reacção que provoca o escurecimento de alimentos (Aljadi e Kamaruddin, 2004).



CAPÍTULO II

Material e Métodos

2.1. AMOSTRAS DE MEL

Neste trabalho utilizaram-se cinco méis comerciais adquiridos no mercado local. Estes foram mantidos no escuro à temperatura ambiente até análise mais aprofundada.

A preparação dos reagentes para as várias análises efectuadas estão descritos em anexo.

2.2. CARACTERIZAÇÃO POLÍNICA

As amostras foram submetidas à análise polínica qualitativa pelo método acetolítico de Erdtman (1986). A amostra foi dissolvida em água destilada e o sedimento foi concentrado por centrifugações repetidas a 1500 rpm durante 30'. Adicionaram-se cerca de 10 mL da mistura de ácido acético-anídrico ($(C_2H_3O)_2O$) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) (9:1). Os tubos foram incubados em banho-maria (100 °C durante 3 min), agitados vigorosamente, e de seguida, centrifugados e decantados. Adicionaram-se, posteriormente, cerca de 12 mL de ácido acético, agitou-se cuidadosamente, seguindo-se uma centrifugação e decantação. O precipitado foi lavado e ressuspensão em 12 mL de água destilada, centrifugado e decantado. Adicionou-se 12 mL de KOH 7%, agitou-se cuidadosamente, centrifugou-se e decantou-se. Efectuou-se uma preparação microscópica com uma gota de sedimento e uma gota de glicerogelatina, fixada à chama e solidificada antes da observação. Foram contados um mínimo de 1200 grãos de pólen por amostra. A identificação dos vários tipos de pólen foi efectuada com base na colecção de referência da Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Bragança. Os termos usados para as classes de frequência de pólen foram os seguintes: pólen predominante (P, mais de 45% de grãos de pólen contados), pólen secundário (S, 16-45%) e pólen de menor importância (M, 3-15%). Quanto às cores, os méis foram classificados de acordo com a escala de Pfund, comparando com as cores padrão.

2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MEL

Todos os ensaios das análises físico-químicas foram realizados em triplicado.

2.3.1. Humidade

A determinação da humidade foi feita por refratrometria, utilizando-se um refratrómetro Abbe (refrarometro digital Atago, Alemanha), segundo o Método Oficial 969,38 (AOAC, 1990). Todas as medições foram realizadas a 20 °C. Os resultados expressam-se em % (p/p).

2.3.2. Condutividade Eléctrica

A condutividade eléctrica foi determinada de acordo com o método descrito por Sancho *et al.*, (1991). Dissolveram-se 10 g de mel em 75 ml de água destilada. A solução foi colocada num banho a 20°C e após ter atingido o equilíbrio, fez-se a leitura da amostra num condutivímetro Inolab, 1999. O valor obtido foi multiplicado por 1,5 e os resultados apresentados em mS/cm (10^{-3} S/cm).

2.3.3. Cinzas Totais

O conteúdo de cinzas do mel foi determinado por condutivimetria, de acordo com a metodologia proposta por Sancho *et al.* (1991). Quando o resultado foi inferior a $0,9 \times 10^{-3}$ S/cm converteu-se o valor em 10^4 S/cm e determinou-se o teor em cinzas consultando a tabela referida por Sancho *et al.* (1991).

2.3.4. pH

Misturaram-se 10g de mel em 75 mL de de água destilada. Esta solução foi colocada num banho a 20 °C até atingir o equilíbrio. Posteriormente, o pH foi determinado por leitura directa com o medidor de pH (Meter Basic 20, 2002). O método usado foi o descrito por Bogdanov *et al.* (1997).

2.3.5. Acidez Livre

A acidez livre foi determinada por titulação volumétrica (AOAC, 1990; Método Oficial 962,19). Dissolveram-se 10 g de mel em 75 mL de água destilada, de seguida adicionaram-se 4 a 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína. Esta solução foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N até a mudança de cor se manter durante 10 segundos.

O valor da acidez (miliequivalente de ácido por Kg de mel) foi determinado, multiplicando por 10 o volume de NaOH usado na titulação.

2.3.6. Açúcares Redutores

Para a determinação do teor de glucose e frutose do mel seguiu-se o método descrito por Bogdanov *et al.* (1997). Dissolveram-se 2 g de mel em 50 mL de água destilada, transferiram-se para um balão volumétrico de 200 mL e perfez-se o volume com água destilada (solução de mel). Retiraram-se 50 mL desta solução de mel para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada (solução diluída de mel). Para a titulação preliminar, num copo de 250 mL, adicionaram-se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, 7 mL de água destilada e 15 mL da solução diluída de mel, previamente colocada numa bureta de 25 mL. A solução contida no copo foi aquecida até a ebulição e ferveu durante 2 minutos, de seguida adicionou-se 1 mL de azul de metileno a 0,2%. Esta solução foi titulada com a solução diluída de mel contida na bureta até haver descoloração do indicador. Subtraiu-se a 25 mL o volume da solução diluída de mel gasto na titulação (contido na bureta), correspondendo este resultado ao volume de água usado na dosagem. Para a dosagem, num copo graduado de 250 mL pipetaram-se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, o volume de água destilada determinado na titulação preliminar e 12,5 mL de solução diluída de mel contida na bureta. A solução foi aquecida e ferveu durante 2 minutos, após os quais se adicionou 1 mL de azul de metileno 0,2%. Esta solução foi titulada com a solução diluída de mel da bureta até se verificar mudança de cor.

A determinação do teor em açúcares redutores (C) foi efectuada de acordo com a seguinte equação:

$$C = \frac{2000}{PV}$$

em que P é o peso da amostra de mel (g) e V é o volume da solução diluída de mel gasto na dosagem (mL).

2.3.7. Sacarose Aparente

Para a determinação da Sacarose Aparente, usou-se o Método de Inversão (Bianchi, 1990; Dec. Lei nº131/85). Dissolveram-se 2g de mel em 200 mL de água destilada (Solução de mel). Desta solução, retiraram-se 50 mL para um balão de 100 mL e adicionaram-se 25 mL de água destilada. Aqueceu-se até 64 °C num banho. Posteriormente retirou-se do banho e adicionou-se 10 mL de HCl 6,34 N. Após arrefecimento à temperatura ambiente, deixou-se repousar cerca de 15 minutos, aqueceu-se até 20 °C e neutralizou-se com NaOH 5 N utilizando papel indicador. Seguidamente, completou-se o volume até 100 mL (Solução diluída de mel).

Os procedimentos “Titulação preliminar” e “Dosagem” são idênticas aos referidos para a Determinação do Açúcares Redutores

Na determinação do teor em sacarose aparente utilizou-se a expressão:

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

2.3.8. Hidroximetilfurfural (HMF)

O valor de HMF do mel foi determinado de acordo com o método padrão da AOAC (1990) Método Oficial 980,23. Dissolveram-se 5 g de mel em 25 mL de água destilada e transferiram-se para um balão volumétrico de 50 mL, ao qual foram adicionados 0,5 mL de solução Carrez I e 0,5 mL de solução Carrez II e fez-se o volume com água destilada. Depois de filtrar esta solução, os primeiros 10 mL de filtrado foram rejeitados e recolheram-se aliquotas de 5 mL para dois tubos de ensaio. A um dos tubos adicionaram-se 5 mL de água destilada (solução amostra) e ao outro 5 mL de solução bissulfito de sódio 0,2% (controlo). Leu-se a absorvância das soluções a 284

e 336 nm num espectrofotômetro UV–visível (Varian Cary 50 Scan, 1998). O valor de HMF foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

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

2.3.9. Índice Diastásico

O índice diastásico do mel foi determinado de acordo com o Método Oficial AOAC 958,09 (AOAC, 1990). Dissolveram-se 10 g de mel em 5 mL de solução tampão acetato pH 5,3 e 20 mL de água destilada. Num balão volumétrico de 50 mL, colocaram-se 3 mL de solução de cloreto de sódio 0,5 M e a solução de mel, e fez-se o volume com água destilada. Transferiram-se 10 mL desta solução para dois balões volumétricos de 50 mL (balão 1 = solução de referência; balão 2 = solução amostra) que foram colocados num banho a 40 °C, juntamente com a solução de amido com um índice de azul entre 0,5 e 0,55. Os balões volumétricos são apoiados em argolas metálicas ficando deste modo mais estáveis em banho. Após 15 minutos no banho, foram adicionados 5 mL de água destilada ao balão 1 e 5 mL de solução de amido ao balão 2. Em intervalos de tempo de 5 minutos, transferiram-se 1 mL dos balões 1 (referência) e 2 (amostra) para balões volumétricos de 50 mL que continham 10 mL de solução de iodo 0,0007 N e 35 mL de água destilada. Leu-se a absorvância da solução amostra (balão 2) a 660 nm, usando como branco a solução referência (balão 1), num espectrofotômetro Perkin Elmer (Norwalk, E.U.A.). A absorvância da amostra foi lida de 5 em 5 minutos, até se atingir um valor inferior a 0,235. Para determinar o tempo em que a absorvância atingiu esse valor, efectuou-se um gráfico de absorvância em função do tempo. Os resultados foram expressos em graus Gothe. O índice diastásico (ID) foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

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

Em que t = tempo

2.3.10. Actividade da Água

A actividade de água foi determinada colocando directamente cada uma das amostras de mel num medidor de a_w (Rotronic Hygroskop DT, 2000).

2.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

2.4.1. Quantificação de microrganismos mesófilos

Dez gramas de mel foram diluídos em água peptonada 0,1% (1:10, p:v), considerando-se assim a suspensão inicial. Após homogeneização efectuaram-se diluições decimais. Transferiu-se 1 mL de suspensão inicial (10^{-1}) para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada estéril. Repetiu-se o processo para obter várias diluições. Inoculou-se 1 mL da suspensão (10^{-1}) para uma placa de Petri estéril, este procedimento realizou-se em triplicado. O passo anterior repetiu-se para as restantes diluições decimais.

Colocaram-se 12 a 15 mL de meio de cultura PCA a 44 – 47 °C em cada placa de Petri. Após completa solidificação, incubaram-se as placas na estufa em posição invertida a 30 ± 1 °C durante 72 ± 3 h. Após ter decorrido o período de incubação, contaram-se as colónias presentes em cada placa (ISO 4833/2003).

Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias por grama (UFC/g).

$$\text{UFC/g} = \frac{\sum C}{V(n_1 + n_2)d}$$

Sendo:

UFC – unidades formadoras de colónias;

$\sum C$ – soma das colónias de todas as placas contadas;

d – diluição a partir do qual se obtiveram as primeiras contagens;

n_1 – número de placas da primeira diluição contada;

n_2 – número de placas da segunda diluição contada;

V – volume do inóculo semeado em cada placa.

2.4.2. Quantificação de bactérias sulfito-redutoras

Em tubos de ensaio colocou-se 10 mL, 5 mL, 1 mL e 0,1 mL de amostra. Os tubos foram colocados em banho-maria a 80 °C, durante 10 minutos para inactivar a

amostra. Preparou-se o meio TSA (Tryptose Sulfito Agar) e adicionou-se ainda quente, 44-45 °C às amostras anteriores. O volume de meio colocado em cada tubo foi cerca de 3 vezes o volume de amostra. Os tubos foram incubados na estufa a 37 °C ± 1 °C durante 48h. Foram considerados positivos os tubos em que apareceu um precipitado negro à volta das colónias. (NP-2262:1986)

2.4.3. Quantificação de leveduras osmófilas e bolores xerófilos viáveis

Diluiu-se a amostra em Água Peptonada 0,1 % (1:10, v:v) – Suspensão inicial (10^{-1}). Procedeu-se às diluições decimais como descrito no procedimento de quantificação de microrganismos mesófilos. Inoculou-se 0,1 mL da suspensão inicial para uma placa de petri contendo meio DG18. O procedimento foi realizado em triplicado. Repetiu-se o passo 5 para as restantes diluições decimais obtidas. Espalhou-se o inóculo na superfície do meio DG18 com um espalhador estéril. As placas foram incubadas na estufa a 25 °C durante 7 dias. Após ter decorrido o período de incubação seleccionaram-se as placas que continham menos que 150 colónias e contaram-se os mesmos. Quando necessário recorreu-se à observação por microscopia de forma a distinguir as colónias de leveduras e propágulos de bolores das colónias de bactérias. (ISO 21527-2/2006)

Os resultados foram apresentados em UFC/g de acordo com a fórmula descrita para a quantificação de microrganismos mesófilos.

2.4.4. Quantificação de coliformes fecais pelo método da estimativa do número mais provável.

Inocularam-se tubos de LST (Lauril Sulfato Tryptose) com 0,1 mL, 1 mL e 10 mL de amostra e incubaram-se a 37 °C durante 24h. O procedimento foi feito em triplicado. Considerou-se positivo qualquer tubo que apresentou turvação do meio ou formação de gás no tubo de Durham, em que o gás atingir pelo menos um décimo da altura do tubo, caso contrário incubou-se durante mais 24h (48 incubação total).

Para confirmação de coliformes fecais, inocularam-se os tubos com resultado presumível positivo ou duvidoso num tubo de caldo de BGLB (Brilliant Green Lactose Broth). Incubaram-se os tubos a 45,5 °C durante 24 ± 2h. Considerou-se positivo qualquer tubo que apresentou formação de gás no tubo de Durham, devendo o gás

atingir pelo menos um décimo da altura do tubo. Reincubaram-se os tubos negativos ou duvidosos e observaram-se novamente após 24h (48 incubação total) (ISSO 9308-1 : 2000). Calculou-se o NMP de coliformes fecais por g ou mL de amostra.

2.4.5. Pesquisa de *Salmonella* spp. por meios selectivos e diferenciais

Pesou-se 25 g da amostra e adicionou-se 225 mL de água peptonada tamponada (diluente de pré-enriquecimento). Incubou-se a suspensão-mãe a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas ± 2 h. Transferiram-se 0,1 mL e 1 mL para tubos contendo 10 mL de caldo RV e MKTTn, respectivamente. Incubou-se o tubo de caldo RV a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o tubo de caldo MKTTn a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas ± 3 h.

Usando a cultura obtida no caldo RV, inoculou-se a superfície de uma placa de Petri de 140 mm de diâmetro contendo XLD agar. Procedeu-se de igual forma para o meio de cultura SS agar. Repetiu-se o mesmo procedimento usando a cultura obtida no caldo MKTTn. Incubaram-se as placas de XLD agar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas ± 3 h e as de SS agar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas (se negativo após este período de incubação, incubar mais 24 horas), ambas em posição invertida.

Consideraram-se presumivelmente positivas colónias em XLD agar que apresentaram centro negro e uma zona envolvente ligeiramente transparente devido à mudança de cor do indicador, colónias cor-de-rosa com um centro rosa mais escuro, colónias amarelas com ou sem escurecimento do centro; colónias em SS agar incolores com centro negro, e o meio envolvente amarelo-acastanhado e colónias que não apresentaram centro negro.

Repicou-se 5 colónias suspeitas (*Salmonella* presumível) para placas contendo agar nutritivo. Incubaram-se as placas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas ± 3 h. A confirmação físico-química foi efectuada apenas para culturas puras efectuando os seguintes testes: Teste do TSI, Teste da Ureia e Teste do indol (em anexo) (ISO 6579:2002).

2.5. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.5.1. Preparação do Mel

As amostras de mel foram pasteurizadas a 75 °C durante 30 minutos, antes de se proceder à avaliação de actividade antimicrobiana.

2.5.2. Microrganismos e Condições de Cultura

Os microorganismos utilizados nos ensaios foram isolados no laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança.

Foram usadas 3 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* ESA1, *Zygosaccharomyces rouxii* ESA 23 e *Zygosaccharomyces mellis* ESA 35) isoladas a partir de méis de Trás-os-Montes, e *Zygosaccharomyces bailii* ESA 11 isolada a partir de um vinho. Os microrganismos cresceram aerobicamente em meio líquido YNB (Yeast Nitrogen Base) numa incubadora orbital (SI50, 2002).

2.5.3. Método

A avaliação da actividade antifúngica e a determinação da concentração necessária para reduzir em 50% a taxa específica de crescimento (EC_{50}) foram efectuadas em meio líquido.

As culturas em fase exponencial de crescimento foram utilizadas como inóculo nas experiências de crescimento. Para isso, foi transferido um volume que assegurasse uma densidade óptica inicial de 0,1, para balões de 200 mL de meio YNB adicionados de mel à concentração desejada (10, 25 e 50%). O crescimento foi realizado por introdução dos balões numa incubadora orbital (SI50, 2002). Para cada uma das experiências foi também inoculado um balão controlo (0% de mel), contendo 200 mL de meio YNB.

Ao longo do tempo, geralmente de duas em duas horas, foram retiradas amostras para medição da densidade óptica a 640 nm. Quando necessário procedia-se à diluição das amostras, para obter leituras de absorvância na parte linear da curva padrão que

relaciona a densidade óptica com o número de células. Em todas as leituras, usamos como branco o meio de cultura. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

2.5.4. Cálculo das Taxas Específicas de Crescimento

As taxas específicas de crescimento (μ) foram calculadas a partir do declive da relação linear entre os valores experimentais da densidade óptica a 640 nm e o tempo de cultura, tendo-se utilizado o método dos mínimos quadrados, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Ln } N_t = \text{Ln } N_0 + \mu t$$

em que μ corresponde à taxa específica de crescimento, expressa em unidades do inverso do tempo (ln^{-1} , por ex.), e N_t e N_0 à densidade populacional, expressa em D. O. 640 nm, ao fim do tempo t e t_0 , respectivamente.

2.6. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

A actividade antioxidante das 4 amostras de mel (visto uma ter acabado) foi determinada pelo método do poder redutor.

O poder redutor de um composto pode servir como indicador de uma potencial actividade antioxidante.

Neste trabalho o poder redutor foi determinado de acordo com o método descrito por Berker *et al.* (2007). Misturou-se 1 mL de mel com 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de ferrocianato de potássio (10 mg/mL).

A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 minutos. De seguida, foram adicionados 0,5 mL de ácido tricloroacético (100 mg/mL) e agitou-se vigorosamente. Posteriormente retirou-se 2,5 mL do sobrenadante e adicionou-se 2,5 mL de água desionizada e 0,5 mL de cloreto de ferro (1 mg/mL). A absorvância da mistura foi medida a 700 nm num espectrofotómetro (Unicam Espectrometria UV-Visível Hekios, Reino Unido).

Efectuou-se um gráfico de absorvância registada a 700 nm. A concentração de extracto de 0,5 de absorvância (EC_{50}) foi calculada em função da concentração do mel correspondente.

Os reagentes BHA (2-ter-butil-4-metoxifenol) (Sigma) e o α -tocoferol (Sigma) foram usados como padrões.

2.7. COMPOSTOS BIOACTIVOS

2.7.1 Compostos Fenólicos totais

Utilizou-se o método Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) para determinar os compostos fenólicos totais. Cinco g de mel foram diluídos em 50 mL de água destilada e filtrados. Esta solução (0,5 mL) misturou-se com 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 0,2 N. Após 5 min, adicionou-se 2 mL de 75 g/L de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Após a incubação à temperatura ambiente por 2 h, mediu-se a absorvância da mistura a 760 nm contra um branco (metanol). Utilizou-se o ácido gálico (0-200 mg / L) como padrão. O total de compostos fenólicos foi expresso em mg de ácido gálico equivalentes (GAME) / 100 g de mel (citado por Meda *et al.*, 2005).

Foram efectuadas 3 repetições para cada ensaio.

2.7.2. Flavonóides

Num tubo de ensaio colocaram-se 250 μL de mel, 75 μL NaNO_2 a 5% e 1,25 mL de água destilada. Após 5 minutos, adicionou-se 150 μL de $\text{AlCl}_3\text{H}_2\text{O}$ a 10%. Ao fim de 6 minutos juntou-se 500 μL de NaOH 1M e 275 μL de água destilada. Agitou-se vigorosamente e leram-se as absorvâncias no espectrofotómetro a 510 nm. A curva de calibração foi feita com o reagente catequina (2,5-40 mg/L). Os ensaios foram realizados em triplicado. O método usado para a determinação de flavonóides foi o método de Zhishen *et al.*, (1999) (citado por Liu *et al.*, 2009). Esta análise foi efectuada em triplicado.



CAPÍTULO III

Resultados e Discussão

3.1. AMOSTRAS

Foram usados frascos de diferentes lotes para análise dos vários méis em estudo.

Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.2. ANÁLISE POLÍNICA

Os resultados da análise do perfil de pólen do mel permitem determinar a sua origem floral. A identificação dos pólenes e a sua frequência nos cinco méis analisados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Predominância de pólen e cores dos 5 méis analisados

Amostra/Cor	Classe de frequência ^a	Identificação de pólen (frequência)
Mel 1 Mel âmbar	P	<i>Eucaliptus</i> sp. (70,7%)
	S	<i>Pinus</i> sp. (18,8%)
	M	<i>Rubus</i> sp. (10,5%)
Mel 2 Mel âmbar claro	P	<i>Echium</i> sp. (69,4%)
	S	<i>Leotondon</i> sp. (15,4%)
	M	<i>Eucaliptus</i> sp. (8,7%); <i>Rubus</i> sp. (6,5%)
Mel 3 Mel âmbar muito claro	P	<i>Citrus</i> sp. (75,6%)
	M	<i>Lavandula</i> sp. (15,9%)
	M	<i>Echium</i> (8,5%)
Mel 4 Mel âmbar	P	<i>Eucaliptus</i> sp. (50,2%)
	S	<i>Lavandula</i> sp. (23,0%); <i>Echium</i> sp. (16,8%)
	M	...
Mel 5 Mel âmbar muito claro	--	Sem pólen observado

^a Classes de frequência: P - pólen predominante (mais de 45% de grãos de pólen); S - secundária de pólen % (16-45); M – menor importância de pólen % (3-15).

As diferenças mais relevantes entre os cinco méis analisados foram o tipo e a quantidade de pólen neles presentes. Quatro dos méis analisados são de origem monofloral. De facto, de acordo com Maia (1999), geralmente, o mel para ser considerado monofloral de um pólen tem que apresentar, pelo menos 45 % desse pólen. No entanto, existem algumas exceções, dependendo do tipo de mel. Por exemplo, o mel de eucalipto e citrus deve conter pelo menos 70% de pólen de *Eucaliptus* e *Citrus* sp., respectivamente, para serem considerados monoflorais, enquanto que o mel de *lavandula* só necessita de 15% de pólen de *Lavandula* sp.. Da análise da Tabela 3,

verifica-se que todos os méis são monoflorais: amostra 1, mel monofloral de *Eucalyptus sp.*; amostra 2, mel monofloral de *Echium sp.*; amostra 3, mel monofloral de *Citrus sp.*; amostra 4, mel monofloral de *Lavandula sp.* Na amostra número 5, a quantidade de pólen muito baixa não sendo possível identificar o pólen predominante (mel possivelmente centrifugado).

3.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos analisados nas 5 amostras de meis.

Tabela 3- Parâmetros físico-químicos das amostras de mel (Média ± Desvio Padrão) *

Parâmetros	Mel 1	Mel 2	Mel 3	Mel 4	Mel 5	Limites (UE, 2001)
Humidade (%)	17,2 ± 0,2 a	16,8 ± 0,4 a	15,9 ± 0,1 a	17,03 ± 0,06 a	17,2 ± 0,4 a	≤ 20
Actividade da Água	0,50 ± 0,01 a	0,56 ± 0,01 b	0,52 ± 0,01 c	0,47 ± 0,01 d	0,53 ± 0,01 e	Não está legislado
Condutividade (mS/cm)	0,53 ± 0,01 a	0,39 ± 0,01 b	0,4 ± 0,1 c	0,19 ± 0,01 d	0,31 ± 0,03 e	< 0,8
Cinzas (%)	0,35 ± 0,02 a	0,23 ± 0,01 b	0,25 ± 0,01 b	0,07 ± 0,01 c	0,16 ± 0,02 d	< 0,6
pH	4,3 ± 0,7 a	3,9 ± 0,4 a	4,2 ± 0,3 a	4,0 ± 1,0 a	3,7 ± 0,3 a	Não está legislado
HMF (mg/Kg)	18,0 ± 3,0 a	94,0 ± 8,0 b	20,0 ± 1,0 a	32,0 ± 7,0 b	76,0 ± 8,0 b	≤ 40
Acidez Livre (meq.Ac/Kg)	27,0 ± 5,0 a	25,0 ± 3,0 b	32,0 ± 4,0 c	16,0 ± 2,0 d	25,0 ± 2,0 b	< 50
Açúcares Redutores (%)	67,7 ± 0,5 a	73,7 ± 0,4 a	71,4 ± 0,6 a	71,0 ± 0,4 a	71,8 ± 0,3 a	≥ 60 à excepção do mel de citrinos (≥ 45)
Sacarose aparente (%)	3,4 ± 0,5 a	6,7 ± 0,2 b	9,7 ± 0,2 c	6,6 ± 0,3 b	3,8 ± 0,2 a	≤ 5, à excepção do mel de citrinos (≤ 10) e <i>lavandula</i> (≤ 15)
Actividade Diastásica (Escala de Gothe)	13,2 ± 0,5 a	8,7 ± 0,2 b	9,4 ± 0,2 c	12,3 ± 0,3 d	16,1 ± 0,2 e	≥ 8 à excepção do mel de citrinos (≥ 3)

*) As letras (a, b, c, d e e) representam que os méis são diferentes pelo teste de Tukey com significância de $p = 0,05$. Letras iguais representam que não há diferenças significativas pelo teste de Tukey.

As origens geográficas dos diferentes méis são foram analisadas, sendo que os três primeiros méis são de origem portuguesa, o mel 4 é uma mistura de vários méis da UE e o mel 5 da Argentina. Todas as amostras estudadas estavam dentro dos valores

estabelecidos no Decreto-Lei nº 214/2003, excepto o HMF (≤ 40 mg / kg para os méis em geral e ≤ 80 mg / kg para méis de regiões tropicais) e a sacarose aparente ($\% \leq 5$). Visualmente, nenhuma das amostras de mel analisadas revelou sinais de fermentação ou de granulação, antes de iniciar as análises físico-químicas.

O teor de humidade no mel depende das condições ambientais e da manipulação dos apicultores, no período de colheita, e pode variar de ano para ano (Acquarone *et al.*, 2007). Um teor em água elevado pode acelerar a cristalização de certos tipos de méis e aumentar a sua actividade da água podendo favorecer o crescimento de leveduras. Os teores de humidade de amostras de méis variaram de 15,9-17,2, situando-se abaixo do limite imposto pela legislação $\leq 20\%$ (UE, 2001). Não se verificaram diferenças significativas, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), entre os valores de humidade obtidos para as 5 amostras de mel analisadas. Os valores obtidos indicam um grau de maturidade e extracção adequados bem como um bom armazenamento do mel, o elevado teor de humidade pode levar à fermentação durante o armazenamento.

A condutividade eléctrica e acidez livre dos méis cumpriram os requisitos requeridos (inferior a 0,8 mS/cm e 50 meq/kg, respectivamente). A acidez livre do mel pode ser explicada tendo em conta a presença de ácidos orgânicos em equilíbrio com as lactonas correspondentes, ésteres e alguns iões inorgânicos, como o fosfato. Uma acidez elevada pode ser indicativo de fermentação do mel. A actividade de água e o pH, embora não sendo legislados, apresentam-se dentro dos limites propostos por Al-Khalifa e Al-Arif, 1999; Andrade *et al.*, 1999; Azeredo *et al.*, 2003; Terrab *et al.*, 2004. O baixo pH e a_w inibem a presença e o crescimento de microrganismos. Estes parâmetros têm grande importância durante a extracção e armazenamento de mel, visto influenciarem a textura, a estabilidade e o tempo de vida útil (Terrab *et al.*, 2004).

Nenhuma das amostras de mel analisadas apresentaram valores de condutividade eléctrica superior a 0,8 mS/cm (variação entre 0,18 e 0,54 mS/cm), sugerindo que todas as amostras são de néctar. O que é corroborado pelo teor de cinzas totais que foi inferior a 0,6% (UE, 2001). A cor do mel depende de vários factores, sendo o teor em minerais o mais importante. Os méis de cor clara tem geralmente um teor de cinzas inferior aos méis de cor escura (Al *et al.*, 2009). No nosso caso, a cor do mel 1 (*Eucalyptus* sp.) pode ser explicada pelo elevado teor em cinzas.

O teor de HMF é amplamente utilizado como um indicador de frescura do mel, porque está ausente em méis frescos e tende a aumentar durante o processamento e / ou envelhecimento do produto. O HMF é influenciado por diversos factores,

nomeadamente, temperatura e tempo de aquecimento, condições de armazenamento, pH e origem floral (Fallico *et al.*, 2006). Apenas uma das amostras (amostra 2) apresentara níveis de HMF superior ao limite permitido (≤ 40 mg / kg para os méis em geral e ≤ 80 mg / kg para méis de regiões tropicais), sugerindo abuso de temperatura durante a transformação e / ou práticas de armazenamento inadequadas. A diastase é uma enzima secretada pela abelha no mel. O seu teor depende da frescura e origem geográfica e botânica do mel. Tal como acontece com o HMF, o índice diastásico pode ser usado como indicativo de envelhecimento e de abuso de temperatura (Fallico *et al.*, 2006). Todos os méis em análise apresentam valores dentro do permitido por lei.

Em relação aos açúcares redutores (frutose e glucose), a Directiva (UE, 2001) impõe um limite mínimo de 60 g/100g, com excepção para o mel de melada, cujo teor tem de ser ≥ 45 g/100g. Os resultados obtido no nosso trabalho para além de cumprirem os limites estabelecidos na norma foram também idênticos aos observados por outros investigadores (Andrade *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2004; Küçük *et al.*, 2007). Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de açúcares redutores obtidos para as 5 amostras de mel analisadas.

Para os açúcares não-redutores (sacarose aparente) o valor máximo permitido no mel é 5 g/100g, excepto para o mel de citrinos e de eucalipto (≤ 10 g/100 g), bem como o mel de *lavandula* (≤ 15 g/100 g) (UE, 2001). Teores em sacarose aparente elevados são indicadores de uma recolha prematura, isto é, a sacarose ainda não foi totalmente convertida em frutose e glucose (Azeredo *et al.*, 2003). A amostra 3 cumpriu os requisitos legais para méis de citrinos. A amostra número 2 foi a única que ultrapassou os limites estabelecidos na Directiva (UE, 2001). O teor de sacarose observado no mel de *Lavandula* pode ser justificado pela sua origem floral (UE, 2001).

Na Tabela 4 apresentam-se os valores obtidos para os coeficientes de correlação entre os parâmetros físico-químicos das amostras de mel em estudo. A correlação para relações lineares foi considerada para $r > 0,60$. Verificou-se uma correlação positiva entre a condutividade eléctrica, acidez e teor de cinzas. Essas correlações também foram verificadas por Bogdanov *et al.* (1999). De facto, a condutividade eléctrica do mel depende do teor de cinzas e da acidez do mel, os quais refletem a presença de iões e ácidos orgânicos. A correlação positiva entre a actividade diastásica e o teor de água pode ser explicada pelo aumento da actividade da enzima em meio aquoso. A correlação positiva verificada entre os valores de a_w e o teor de HMF pode ser justificada por um processamento inadequado, na verdade, o aquecimento e as condições de

armazenamento podem aumentar o nível de HMF. Também nestas condições, pode verificar-se um aumento da a_w devido às propriedades higroscópicas do mel, contribuindo para a sua deterioração devido à ocorrência de fermentações indesejáveis (Silva *et al.*, 2004).

Tabela 4 – Coeficientes de correlação entre os parâmetros físico-químicos das amostras de méis comerciais analisados

Parametros	Água	Cinzas	Açúcares Redutores	Sacarose Aparente	Actividade Diastásica	Condutiv.	Acidez livre	a_w	HMF	pH
Água										
Cinzas	-0,26									
Açúcares Redutores	-0,25	-0,26								
Sacarose Aparente	-0,42	-0,22	0,47							
Actividade Diastásica	0,61	-0,16	-0,40	-0,48						
Condutividade	0,044	0,93	-0,40	-0,37	-0,004					
Acidez	-0,47	0,75	-0,18	0,056	-0,15	0,61				
a_w	-0,22	0,15	0,47	0,26	-0,23	0,065	0,36			
HMF	0,15	-0,51	0,53	0,12	-0,093	-0,48	-0,35	0,66		
pH	0,088	0,053	-0,40	0,37	-0,064	0,21	0,076	-0,26	-0,43	

3.4. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO MEL

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas efectuadas aos méis comerciais estão sumariados na Tabela 5. No que diz respeito à qualidade comercial (aeróbios mesófilos e bolores e leveduras) os valores obtidos nas amostras de mel analisadas são, para a generalidade dos méis, mais baixos do que os observados por outros investigadores. Iurlina e Fritz (2005), em méis Argentinos verificaram que as contagens de aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras foram de 244 UFC/g e de 344 UFC/g, respectivamente. Em relação à qualidade sanitária (coliformes fecais) e segurança (clostrídios sulfito-redutores e *Salmonella*), os resultados obtidos foram

negativos em todas as amostras analisadas. Iurlina e Fritz (2005) detectaram contaminação por coliformes numa das 70 amostras testadas. Finola *et al.* (2007) detectaram a presença de esporos de clostridium sulfito-redutores em 70% das amostras analisadas.

Tabela 5 – Análise Microbiológica das amostras de mel

Amostras de mel	Aeróbios mesófilos (ufc/g)	Bolores e leveduras (ufc/g)	Coliformes fecais (MPN)	clostridium Sulfito-redutores (em 0,01 g)	<i>Salmonella</i> (em 25 g)
1	<10	<10	<1	negativo	Negativo
2	<10	1,3 x 10 ¹ ± 7,98	<1	negativo	Negativo
3	<10	<10	<1	negativo	Negativo
4	2 x 10 ¹ ± 0,35	2,2 x 10 ¹ ± 2,89	<1	negativo	Negativo
5	<10	1,1 x 10 ¹ ± 5,78	<1	negativo	Negativo

3.5. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

Utilizando a concentração necessária para reduzir em 50% a taxa específica de crescimento (EC₅₀) como parâmetro expressivo dos efeitos inibidores induzidos por cinco méis comerciais no crescimento microbiano, na Tabela 6 apresenta-se uma análise comparativa do comportamento de quatro leveduras fermentativas.

Da análise dos resultados verificam-se que o crescimento das leveduras *Zigosaccharomyces rouxii* ESA56 e *Zigosaccharomyces mellis* ESA38 não foi afectado por nenhum dos méis às concentrações testadas. Estes resultados podem ser justificados pelo facto, destas leveduras terem sido isoladas do mel, pelo nosso grupo de trabalho (Carvalho *et al.*, 2006) e, provavelmente estarem adaptadas às características intrínsecas deste produto. *Saccharomyces cerevisiae* ESA1 e *Zigosaccharomyces bailii* ISA 1307 evidenciaram uma ligeira sensibilidade ao mel. *S. cerevisiae*, embora tenha sido isolada do mel, foi de todas as leveduras testadas a que pior suportou concentrações elevadas, devido provavelmente ao facto de ser uma levedura osmotolerante. *Z. bailii* ISA 1307, foi isolada do vinho, o que poderá justificar a sua susceptibilidade aos méis,

provavelmente por não estar adaptada às condições de stress encontradas neste produto, nomeadamente, baixo potencial redox, elevada pressão osmótica e presença de fitoquímicos com propriedades antimicrobianas.

Adicionalmente, verificou-se que apesar de se observarem algumas diferenças na composição físico-química e melissopalínológica dos méis analisados, o crescimento das leveduras não foi influenciado pelo tipo de mel. Este facto, poderá ser explicado pela presença no mel de outros compostos com a actividade biológica, tais como peróxido de hidrogénio, compostos fenólicos e compostos voláteis. (Mundo *et al.*, 2004; Basualdo *et al.*, 2007).

Tabela 6 – Actividade antimicrobiana dos diferentes méis contra quatro leveduras de fermentação.

Microorganismos	EC 50 (%)				
	Mel 1	Mel 2	Mel 3	Mel 4	Mel 5
<i>S. cerevisiae</i> ESA1	43,27 ± 5,45	> 50	42,71 ± 2,38	42,47 ± 1,99	43,27 ± 12,34
<i>Z. rouxii</i> ESA23	> 50	> 50	>50	>50	>50
<i>Z. mellis</i> ESA35	> 50	> 50	>50	>50	>50
<i>Z. bailii</i> ESA1307	48,39 ± 7,98	49,23 ± 3,67	>50	44,22	46,23 ± 8,98

3.6 ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

O poder redutor dos méis aumentou em função da concentração de mel (0,1 a 75 mg/mL) (Figura 1). Neste ensaio, a cor amarela da solução mudou entre vários tons de verde a azul, dependendo do poder redutor de cada mel. A presença de agentes redutores (isto é, antioxidantes) provoca a redução do complexo de Fe³⁺/ferrocianeto a uma forma ferrosa. Então, a formação de azul “Perl’s Prussian” medida a 700 nm, pode ser usada para monitorizar a concentração de Fe²⁺ (Ferreira *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007).

Na Tabela 7 estão sumariados os valores de EC₅₀ (concentração de mel a que corresponde 50 % de inibição da actividade antioxidante) obtidos pelo método do poder redutor para os extractos metanólicos dos vários tipos de mel. Verificou-se que a

amostra 4 evidenciou uma actividade antioxidante de cerca de metade comparativamente com os outros tipos de mel. Não se verificaram diferenças acentuadas entre as actividades antioxidantes dos méis 2, 3 e 5.

A actividade antioxidante dos méis comerciais foi muito inferior à observada por Ferreira *et al.* (2009) em méis produzidos na Associação de Apicultores do Parque Natural do Montesinho e, por Rebelo e Saraiva (sem data) em méis do Parque Natural da Serra da Estrela.

Adicionalmente verificou-se que o mel evidenciou um poder redutor muito menor do que os padrões BHA (0,12 mg para 3,6 mg/mL) e α -tocoferol (0,13 para 8,6 mg/mL)

Tabela 7- Valores de EC₅₀ (mg/mL) das amostras de mel analisadas

Mel	Poder Redutor
Mel 2	42,241
Mel 3	52,011
Mel 4	100,304
Mel 5	53,105

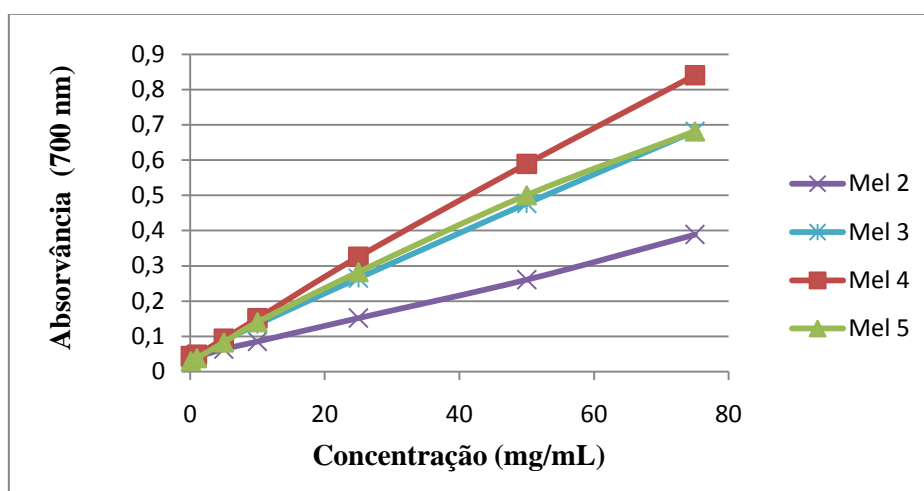


Figura 1- Valores do poder redutor obtidos para os diferentes méis analisados

3.7. COMPOSTOS BIOACTIVOS DO MEL

3.7.1. Flavonóides e Compostos Fenólicos Totais

Esta análise foi igualmente realizada apenas para 4 méis, visto um dos méis ter acabado.

O teor de flavonóides totais de amostras de mel, usando a catequina como padrão ($R^2 = 0,9996$), bem como o teor em fenóis totais, utilizando ácido gálico como padrão ($R^2 = 0,9987$) estão sumariados na Tabela 8.

Tabela 8- Flavonóides e Compostos Fenólicos totais dos méis comerciais (média \pm desvio padrão)

	Flavonóides mg QE/100g	Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/100g)
Mel 2	5,398 \pm 0,01	272,570 \pm 0,04
Mel 3	5,096 \pm 0,00	83,338 \pm 0,03
Mel 4	3,349 \pm 0,01	60,545 \pm 0,02
Mel 5	4,434 \pm 0,01	81,041 \pm 0,02

Da análise da tabela verifica-se que o teor de compostos fenólicos e flavonóides no mel 4 foi inferior ao dos restantes méis em estudo. Este facto, poderá justificar a actividade antioxidante mais baixa observada neste mel comparativamente com os restantes.

À semelhança do verificado por Estevinho *et al.* (2008), o teor de compostos fenólicos do mel claro foi mais baixo do que o observado em méis escuros.

Os resultados obtidos no nosso trabalho tanto para os compostos fenólicos como para os flavonóides foram idênticos aos obtidos por Meda *et al.* (2005).



CAPÍTULO IV

Considerações Finais

No âmbito do presente trabalho foram desenvolvidos estudos tendo como principal objectivo contribuir para a caracterização e avaliação de algumas propriedades biológicas de méis comerciais.

Uma parte considerável do trabalho incluiu estudos sobre as características físico-químicas, melissopalínológicas e, sobre a qualidade microbiológica de méis comerciais. A outra vertente do trabalho contemplou o estudo das actividades antioxidantes e antimicrobianas deste produto alimentar.

Pela análise dos resultados obtidos, podemos concluir:

- Quatro dos méis analisados eram monoflorais (*Eucalyptus* sp., *Echium* sp., *Citrus* sp., e *Lavandula*).
- Os méis comerciais estudados apresentaram características que os situam dentro da legislação Europeia (EU, 2001) e do Decreto Lei nº 214/2003, excepto para o HMF e sacarose aparente.
- De todos os parâmetros físico-químicos analisados, somente a humidade e o pH não apresentaram diferenças significativas entre as amostras, o que demonstra tratar-se de méis com características heterogéneas.
- Verificaram-se correlações positivas entre: condutividade eléctrica, acidez e teor em cinzas; humidade e actividade diastásica; cinzas e condutividade; a_w e HMF.
- A amostra nº 3, cumpre os requisitos para ser considerada mel de citrinos.
- Na globalidade, os méis analisados são seguros do ponto de vista microbiológico e pouco propícios a ocorrência de fermentações.
- O crescimento das leveduras em estudo foi pouco influenciado pela presença de mel ($\leq 50\%$) no meio extracelular.
- O mel que evidenciou a actividade antioxidante mais reduzida foi aquela que apresentou o teor em compostos fenólicos totais e em flavonóides mais baixo.



CAPÍTULO V

Referências Bibliográficas

- Abramovic, H., Jamnik, M., Burkan, L., Kac, M. (2008). Water activity and water content in Slovenian honeys. *Food Control*, **19**, 1086–1090.
- Abu-Tarbousch, H.M., Al-Khatani, H.A., El-Sarrage, M.S. (1993). Floral type identification and quality evaluation of some honey types. *Food Chemistry*, **46**, 13-17.
- Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, **101**, 695-703.
- Al, M.L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S. (2009). Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, **112**, 863–867.
- Ali, A.T. (1991). Prevention of ethanol-induced gastric lesions in rats by natural honey, and its possible mechanism of action. *Scand J Gastroenterol*, **26**, 281–8.
- Ali, A.T. (1995). Natural honey exerts its protective effects against ethanol-induced gastric lesions in rats by preventing depletion of glandular nonprotein sulfhydryls. *Trop Gastroenterol*, **16**, 18–26.
- Ali, A.T., Chowdhury, M.N., Al-Humayyd, M.S. (1991). Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori*. *Trop Gastroenterol*, **12**, 73–7.
- Aljadi, A.M., Kamaruddin, M.Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, **85**(4), 513–518.
- Al-Khalifa, A.S., Al-Arif, I.A. (1999). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi honeys. *Food Chemistry*, **67**, 21-25.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, **22**, 1041-1047.
- Allen, K.L., Molan, P.C., Reid, G.M. (1991). A survey of the anti- bacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol*, **43**, 817–22.
- Andrade, P.C.B. (1996). Tipificação de méis de Erica sp. da Região da Serra da Lousã. Universidade de Coimbra. 330.

- Andrade, P.B., Amaral, M.T., Isabel, P., Carvalho, J.C.M.F., Seabra, R.M., Cunha, A.P. (1999). Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. *Food Chemistry*, **66**, 503-510.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, **63**, 549–562.
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis (15th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1648–1656
- Azeredo, L.C., Azeredo, M.A.A., Souza, S.R., Dutra, V.M.L. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, **80**, 249–254.
- Bahiru, B., Mehari, T., Ashenafi, M. (2006). Yeast and lactic acid flora of tej, an indigenous Ethiopian honey wine: Variations within and between production units. *Food Microbiology*, **23**, 277–282.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, **101**, 502–514.
- Barth, O.M. (1989). O pólen no mel brasileiro. Gráfica Luxor. 1–180.
- Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M.S., Marioli, J.M., (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, **124**, 375-381.
- Bera, A., Almeida-Muradian, L.B. (2007). Physicochemical properties of commercial samples of honey added with propolis from São Paulo state, Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **27**, 49-52.

- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Oriolia, M., Facino, R.M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric /fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, **533**, 185–191.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, İ., Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, **72**, 1157–1165.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007) Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and color of Slovenian honey, Analytical, Nutritional and Clinical Methods. *Food Chemistry*, **105**, 822–828.
- Bianchi, E.M. (1990). Control de calidad de la miel y la cera, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y alimentación (FAO).
- Bogdanov, S. (1999). Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel unter suchung und Hygiene*, **90**, 108–125.
- Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C. (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, **28**, 1-59.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, **22**, 749–760.
- Carvalho, M.C., Rocha, A., Estevinho, L., Choupina, A.B. (2006). Identification of honey yeast species based on RFLP analyses of the ITS region, *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, **1**, 11-17.
- Cavia, M.M., Fernandez-Muiño, M.A., Gomez-Alonso, E., Montes-Pérez, M.J., Huidobro, J.F., Sanchoa, M.T., (2002), Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation, *Food Chemistry*, **78**, 157–161.

- Codex Alimentarius (1998). Codex Alimentarius standard for honey Ref. CL 1998/12-S. FAO and WHO. Rome.
- Codex Alimentarius Commission (1969). Recommended European Standard for Honey. CAC/RS-12-1969. Jt.FAO/WHO Food Stand. Program. Rome. Reprinted in Bee World 51, 79-91. Directive 74/409/EEC.
- Costa, L., Albuquerque, M., Trugo, L., Quinteiro, L., Barth, O., Ribeiro, M., De Maria, C. (1999). Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry*, **65**, 347–352.
- Chaves, A.L.; (2006) Viva Melhor, Com a Medicina do Lar. Edições Une, 12ª Edição.
- Davies, A.M.C. (1976). The application of amino acid analysis to the determination of the geographical origin of honey. *Journal of Food Technology*, **11**, 515–523.
- Decreto-Lei n.º 131/1985, de 29 de Abril. Diário da República Iª Série A.
- Decreto-Lei n.º 214/2003, de 18 de Setembro. Diário da República Iª Série A.
- Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A.H., Dandlya, P.C. (1991) Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, **35**, 77–82.
- Downey, G., Hussey, K., Kelly, J.D., Walshe, T.F., Martin, P.G. (2005). Preliminary contribution to the characterisation of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. *Food Chemistry*, **91**, 347–354.
- Efem, S.E. (1988). Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British Journal of Surgery*, **75**, 679–81.
- Erdtman, G. (1986). Pollen Morphology and Plant Taxonomy: An Introduction to Palynology, Brill Archive.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 3774–3779.

- Esti, M., Panfili, G., Marconi, E., Trivisomo, M. (1997). Valorization of the honeys from the Molise region through physico-chemical, organoleptic and nutritional assessment. *Food Chemistry*, **58**, 125–128.
- Fallico, B., Arena, E., Verzera, A., & Zappalà, M. (2006). The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accred Qual Assur*, **11**, 49–54.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M., Estevinho, L.M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, **114**, 1438-1443.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007). Free radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, **100**, 1511-1516.
- Ferreira, I.C.F.R., Queiroz, M.R.P., Vilas-Boas, M., Estevinho, L.M., Begouin, A., Kirsch, G. (2006). Evaluation of the antioxidant properties of diarylamines in the benzo[*b*]thiophene series by free radical scavenging activity and reducing power. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 1384–1387.
- Finola, M.S., Lasagno, M.C., Marioli, J.M., (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, **100**, 1649–1653.
- Frankel, S., Robinson, G.E., Berenbaum, M.R. (1998). Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, **37**, 27-31.
- Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I. (2004). Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona spp.* and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. *Thermochimica Acta*, **415**, 99–106.
- Gheldorf, N., Wang, X.H., Engeseth, N.J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5870–5877.
- Giangiaco, B., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Facino, R.M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of

- spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics, *An. Chimica Acta*, **533**, 185–191.
- Grange, V., Sanders, S. (1988). Honey in cereal-based new food product. *Cereal Foods World*, **33**, 833–838.
- Gülçin, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2003). Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *Pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology*, **86**, 51–58.
- Haffeejee, I.E., Moosa, A. (1985). Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *BMJ*, **290**, 1886–7.
- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Takura, H., (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **47**, 357–362.
- Irish, J., Carter, D.A., Shokohi, T., Blair, S.E. (2006.) Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*, **44**, 289-291.
- ISO 15213:2003 – “Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions”, International Standards Organization, Switzerland.
- ISO 6579:2002(E) - “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.”, International Standards Organization, Switzerland.
- ISO 4833:2003 – “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C”, International Standards Organization, Switzerland.
- ISO 4831:2006 – “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique”, International Standards Organization, Switzerland.
- ISO 21527-2:2006 – “Greenhouse gases -- Part 2: Specification with guidance at the project level for quantification, monitoring and reporting of greenhouse gas emission reductions or removal enhancements” International Standards Organization, Switzerland.

- ISO 21527:2:2008 – “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95”, International Standards Organization, Switzerland.
- Iurlina, M.O., Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 297– 304.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 3954-3962.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, **100**, 526–534.
- Ladas, S.P., Haritos, D.N., Raptis, S.A. (1995). Honey may have a laxative effect on normal subjects because of incomplete fructose absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 1212–5.
- Loveaux J. (1958). Recherches sur l’origine dans le miel du pollen de plantes entomophiles dépourvues de nectaires. *Annales de l’abeille*. 89-82.
- Lusby, P.E., Coombes, A.L., Wilkinson, J.M. (2005) Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bacteria. *Archives of Medical Research*, **36**, 464–467.
- Maia, M. (1999). Contribuição para a caracterização do mel do Parque Arqueológico do Vale do Côa. Rel. final de Estágio, UTAD, 77.
- Maia, M., Russo-Almeida, P.A., Pereira, J.O.B., (2003). Contribuição para a caracterização do mel da região do Alvão-Marão. *O Apicultor*, **39**, 19-23.
- Meda, A., Lamien, C., Romito, M., Millago, J., Nacoulma, O. (2005). Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, **91**, 571–577.

- Migdal, W., Owczarczyka, H.B., Kedziab, B., Holderna-Kedzia, E., Madajczyk, D. (2000). Microbiological decontamination of natural honey by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry, Food Chemistry*, **57**, 285-288.
- Molan, P.C. (1992). The antimicrobial activity of honey. *Journal Bee World*. **13**, 5-28.
- Mundo, M.A., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, **97**, 1-8.
- Mungoi, E.M.F.Z. (2008). Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. *Tesis Doctoral*. Universidade Autònoma de Barcelona.
- Muñoz, O., Copaja, S., Speisky, H., Peña, R.C., Montenegro, G. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova*. **30**(4), 848-851.
- Nagai, T., Inoue, R., Kanamori, N., Suzuki, N., Nagashima, T. (2006). Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat, *Food Chemistry*, **97**, 256–262.
- Nevas, M., Hielm, S., Lindström, M., Horn, H., Koivulehto, K., Korkeala, H. (2002). High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, **72**, 45– 52.
- Nevas, M., Lindström, M., Hautamäki, K., Puoskari, S., Korkeala, H. (2005). Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 145– 151.
- Norma Portuguesa (NP) 1309, 1976 (Ed. 1). Mel - Determinação da acidez. Instituto Português da Qualidade, Portugal.
- Norma Portuguesa (NP) 1829, 1982. Microbiologia Alimentar. Preparação da amostra para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade, Portugal.
- Norma Portuguesa (NP) 2262, 1986. Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores. Instituto Português da Qualidade, Portugal.

- Norma Portuguesa (NP) 3788, 2002. Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30 °C. Instituto Português da Qualidade, Portugal.
- Olaitan, P.B., Adeleke, O.E., Ola, I.O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, **7**, 159-165.
- Orhan, F., Sekerel, B.E., Kocabas, C.N., Sackesen, C., Adalioglu, G., Tuncer, A. (2003). Complementary and alternative medicine in children with asthma. *Annals of Allergy. Asthma and Immunology*, **90**, 611–615.
- Pereira, A.P., Dias, T., Andrade, J., Ramalhosa, E., Estevinho, L.M. (2009). Mead production: Selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2057–2063
- Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Ariño, A., Juan, T., Herrera, A. (1995). Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chemistry*, **54**, 167–172
- Pires, J., Estevinho, L., Feásc, X., Cantalapiedrad, J., Iglesias, A. (2009). Pollen spectrum and physicochemical attributes of heather (*Erica* sp.) honeys of the North of Portugal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 1862-1870
- Pisani, A., Protano, G., Riccobono, F. (2008). Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*, **107**, 1553–1560.
- Rebelo, J. S. M., Saraiva, S. M. R. (sem data). Actividade Antioxidante do mel. Póster. Escola Secundária de Seia. Centro Experimental de Ciência.
- Rodríguez, G.O., Ferrer, B.S., Ferrer, A., Rodríguez, B. (2004). Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, **84**, 499–502.
- Sancho, M.T., Muniategui, S., Huidobro, J.F., Simal, J. (1992). Evaluating soluble and insoluble ash, alkalinity of soluble and insoluble ash and total alkalinity of ash in honey using electrical conductivity measurements at 20 °C. *Apidologie*, **23**, 291-297.

- Sancho, M.T., Muniategui, S., Sánchez, P., Huidobro, J.F., Simal, J. (1991). Mieles del País Vasco, XI: Evaluación de los distintos tipos de cenizas. *Anales de Bromatología*, **4**, 311-324.
- Serra, B.J, Ventura, C.F. (1995). Characterization of Citrus honey (Citrus spp.) produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2053-2057.
- Serra, M.C.C. (sem data) As propriedades antioxidantes do mel. Centro de Estudos de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa
- Silva, C., Queiroz, A., Figueiredo, R. (2004). Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado de Piauí para diferentes floradas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **6**, 260 – 265.
- Singleton, V.L.,Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178
- Snowdon, J. A., Cliver, J. O. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, **31**, 1-26
- Sodré, G.S., Marchini, L.C., Moreti, A.C.C.C., Otsuk, I.P., Carvalho, C.A.L., (2007). Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. *Ciência Rural*, 37 (4), 1139-1144.
- Sporns, P., Plhak, L., Friedrich, J. (1992). Alberta honey composition. *Food Research International*, **25**, 93–100.
- Storz, G., Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, **2**, 188–194.
- Subrahmanyam, M., Sahapure, A.G., Nagane, N.S., Bhagwat, V.R., Ganu, J.V. (1991). Topical application of honey in the treatment of burns. *Annals of Burns and Fire Disasters*, **78**, 497–8.
- Swallow, K., Low, N. (1990). Analysis & quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **38**, 1828–1832.

- Taormina, P.J., Niemira, B. A., Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, **69**, 217–225
- Terrab, A., Diez, M.J., Heredia, F.J. (2002). Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*, **79**, 373–379.
- Terrab, A., Recamales, A.F., Hernanz, D., Heredia, F.J. (2004) Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chemistry*, **88**, 537–542.
- Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L, Hess-Pierce, B., Kader, A.A. (2001). HPLC-DAD-ESIMS Analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4748-4760.
- Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., Re, E. (2008). Honey diastase activity modified by heating, *Food Chemistry*, **106**, 883–887
- Tuzen, M., Silici, S., Mendil, D., Soylak, M. (2007). Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chemistry*, **103**, 325–330
- UE, 2001. Council Directive 2001/110 relating to honey. *Official Journal of the European Communities*.
- Weston, R.J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, **71**, 235-239
- Whirter, A., Clasen, L. (1997). Alimentos Bons, Alimentos Perigosos, Guia Prático para uma Alimentação Segura e Saudável. Selecções do Reader's Digest, 1ª Edição, Lisboa
- White, J. W. (1975). In E. Crane (Ed.), Honey: A comprehensive survey. London: *Heinemann*, chap. 5.
- White, J. W. (1975). Composition of honey. In E. Crane (Ed.), Honey, a comprehensive survey, London, UK: *Heinemann*, **5**, 157–206
- White, J. W. (1978). Honey. *Adv. Food Res*, **24**, 287–374.

- White, J. W. (1979). Composition of honey. In: Carne E, editor. Honey. A comprehensive survey. London: *Heinemann*,. 157–207.
- White, J. W., Maher, J. (1980). Hidroxymethylfurfural content of honey as an indicator of its adulteration with invert sugars. *Bee World*, **61**, 29–37.
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., D'Arcy, B., Datta, N., Caffin, N., Raimont, K. (2004). Flavonoid in Australian Malaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food ResearchInternational*, **37**(2), 166–174.
- Zalibera, M., Staško, A., Š lebodová, A., Jančovičová, V., Čermáková, T., Brezová, V. (2008). Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys – An electron paramagnetic resonance study. *Food Chemistry*, **110**, 512–521
- Zheng, W., Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(11), 5165–5170.
- Zumla, A., Lulat, A. (1989) Honey – a remedy rediscovered. *Journal of Royal Society of Medicine*, **82**, 384–385.

Anexos

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POLÍNICA

Glicerogelatina

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

Solução corante de fucsina básica

Dissolver 0,5 g de fucsina básica em 1 mL de etanol 70%, e perfazer o volume de 150 mL com água destilada.

Solução alcoólica de fenolftaleína (indicador):

Dissolver 1 g de fenolftaleína em 60 mL de álcool e diluir em água até 100 mL.

Solução de Carrez I

Num balão de 100 ml, dissolver 15 g de Ferrocianeto de potássio trihidratado ($K_4(FeCN)_6 \cdot 3H_2O$) numa porção de água destilada. Depois de totalmente dissolvido, perfazer o volume com água destilada.

Solução de Carrez II

Num balão de 100 ml, dissolver 30 g de acetato de zinco dihidratado $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ numa porção de água. Após a solução estar dissolvida, perfazer o volume com água destilada.

Solução de bissulfito de sódio a 0.2% (validade de 24 horas)

Num balão de 100 ml, pipetar 0,38 ml de bissulfito de sódio e perfazer o volume com água destilada.

Solução Stock de iodo

Pesar 22 g de iodeto de potássio (p.a.) e dissolver em 100 mL de água destilada. Pesar 8,8 g de iodo (p.a.) e adicionar à solução anteriormente dissolvida. Diluir até 1 L com água destilada.

Solução de iodo (0.0007N) (validade de 48h)

Num balão volumétrico de 500 mL, dissolver 20 g de iodeto de potássio (p.a.) em 30 mL de água. Adicionar 5 mL de solução stock de iodo e completar-se o volume com água destilada até 500 mL.

Tampão acetato, pH 5.3

Num balão de 500 mL, dissolver 87 g de acetato de sódio trihidratado em 400 mL de água. Numa proveta de 20 mL, colocar 4,4 mL de ácido acético glacial em 5 mL de água destilada e perfazer o volume até 10,5 mL. Adicionar a solução de ácido acético diluído ao balão de 500 mL com a solução de acetato de sódio e perfazer o volume até 500 mL com água destilada. Ajustar o pH a 5,3 com acetato de sódio ou ácido acético.

Solução de cloreto de sódio 0.5M

Dissolver 14,5 g de cloreto de sódio (p.a.) em água destilada e completar até 500 mL.

Solução de amido para determinação do índice de azul

Pesar 1,60 g de amido anidro e dissolver em 45 mL de água num copo de 50 mL. Levar rapidamente à ebulição, agitando sempre, durante 3 minutos. Deixar arrefecer à temperatura ambiente. Adicionar 2,5 mL de tampão acetato. Deitar o conteúdo num balão de 100 mL, colocar num banho-maria a 40°C e completar com água até 100 mL. Num balão de 100 mL, adicionar 75 mL de água, 1 mL de ácido clorídrico, 1,5 mL de solução de iodo 0,02N. Adiciona-se também 0,5 mL da solução de amido e completar com água até 100 mL. Deixar repousar, durante 1 hora, no escuro. Ler a Absorvância a 660 nm, comparando com a solução testemunho de composição idêntica excepto a solução de amido. A Absorvância deve estar compreendida entre 0,5 e 0,55, caso contrário é necessário efectuar outras soluções de amido com quantidades variáveis deste açúcar. O cozimento do amido é feito da seguinte forma: pesar o dobro do amido determinado no procedimento anteriormente descrito e adicionar 90 mL de água num

copo de 250 mL. Levar rapidamente à ebulição, agitando sempre, durante 3 minutos. Cobrir e deixar arrefecer à temperatura ambiente. Deitar o conteúdo num balão de 100 mL, colocar num banho-maria a 40°C até que a solução adquira esta temperatura. Completar o volume com água destilada.

Licor de Fehling (Soxhlet):

- Solução A

Dissolver 69,28 g de sulfato de cobre pentahidratado em água destilada. Completar até 1 L. Deixar repousar 1 dia antes de usar.

- Solução B

Dissolver 346 g de tartarato de sódio potássio e 100 g de hidróxido de sódio em água destilada. Completar até 1 L e filtrar.

Solução de azul-de-metileno (0.2%)

Dissolver 2 g de azul-de-metileno em água destilada e diluiu-se até 1 L.

Solução padrão de açúcar invertido (10g/L)

Pesar 9,5 g de sacarose pura. Adicionar 5 mL de ácido clorídrico (36.5% p/p) e dissolver em água até 100 mL. Diluir em seguida até 1000 mL. Neutralizar com um volume apropriado de NaOH a 0,1N (40 g/L) antes de ter sido utilizado e diluiu-se até à concentração necessária para a normalização 2 g/L.

AValiação da Actividade Microbiológica

Água peptonada (0,1%)

Diluir 0,1g de água peptonada em 100 mL de água destilada. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Meio PCA (Plate Count Agar)

Dissolver num litro de água 22,5g de PCA. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir cerca de 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

Meio DG 18

Suspender 15,75g de DG 18 em 500 mL de água destilada. Aquecer para dissolver completamente. Adicionar 110g de glicerol. Reidratar 1 frasco de suplemento cloranfenicol e adicionar à base de agar DG 18. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Caldo de Lauril Sulfato-Triptona (LST)

Dissolver os componentes em água destilada e distribuir 10 mL por cada tubo para análise. Esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Ajustar a pH 6,8 ± 0,2.

Caldo de lactose, bÍlis e verde brilhante (BGLB)

Dissolver a peptona e a lactose em 500 mL de água destilada. Adicionar a Oxgall previamente dissolvida em 200 mL de água destilada. Ajustar a pH 7,0-7,5. Agitar e adicionar água até perfazer 975 mL. Ajustar a pH 7.4. Adicionar 13,3 mL de solução aquosa de verde brilhante 0.1%. Adicionar água destilada até perfazer 1 L. Distribuir pelos tubos de análise e autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. pH final 7,2 ± 0,1

Teste do TSI (Triple Sugar Iron agar)

Com um fio recto, inocular por picada profunda e estriamento à superfície uma rampa de TSI agar. Incubar a 37 °C ± 1 °C durante 24 horas ± 3 h. Interpretar as alterações no meio da seguinte forma:

a) Se o fundo apresentar cor amarela classifica-se como glucose-positivo. Se a cor apresentada for vermelho ou não apresentar alteração revela um resultado glucose-negativo. Se por sua vez se verificar o fundo negro significa que há formação de H₂S (no meio do tubo). A possível presença de bolhas de ar no fundo significa formação de gás pela fermentação da glucose.

b) A cor amarela na superfície do tubo representa lactose e/ou sacarose-positivo, e a cor vermelha ou ausência de alteração significa lactose e/ou sacarose-negativo.

As culturas típicas de Salmonella revelam no fundo do tubo cor amarela, indicativa da fermentação da glucose. No meio do tubo observa-se cor preta, devido à produção de H₂S e também bolhas de ar, indicando produção de gás, enquanto na superfície da rampa a cor vermelha indica a ausência de fermentação de lactose e sacarose. Quando se trata de uma Salmonella lactose-positiva, a superfície da rampa é

amarela. Deste modo a confirmação de Salmonella não se deve basear apenas no teste do TSI agar.

Teste da Ureia

Com uma ansa, inocular a superfície da rampa por estriamento com a colónia suspeita. Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas ± 3 h. Se a reacção for positiva, o vermelho-fenol muda de vermelho para rosa claro e posteriormente para rosa escuro.

Teste do indol

Inocular um tubo contendo 5 mL de caldo de triptona com a colónia suspeita. Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas ± 3 h. Adicionar 1 mL de reagente de Kovacs. A formação de um anel vermelho à superfície indica reacção positiva. Um anel amarelo acastanhado indica reacção negativa.

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

Meio YNB Sólido

Pesar 20 g de glucose, 10 g de peptona, 5 g de extracto de levedura e 20 g de agar. Adicionar 1 litro de água. Autoclavar durante 20 minutos a 121°C . Distribuir cerca de 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

Meio YNB Líquido

Pesar 20 g de glucose, 10 g de peptona e 5 g de extracto de levedura. Adicionar 1 litro de água. Autoclavar durante 20 minutos a 121°C .

ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DO PODER REDUTOR

Tampão fosfato de Sódio 0,2 M com pH 6,6

Dissolver 6,95 g do reagente $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ em 250mL de água destilada, obtendo uma solução ácida. Para a solução di-básica dissolvem-se 14,2 g do reagente Na_2HPO_4 num balão 500 mL de água destilada. Para a realização do tampão fosfato,

num balão de 500 mL colocam-se 62,5% do volume de solução dibásica e o restante de solução ácida.

Ferrocianato de potássio (1%)

Pesar 1,5 g de Ferrocianeto de potássio e dissolver em água. Perfazer o volume até 150 mL.

Ácido Tricloroacético (10%)

Pesar 15 g de Ferrocianeto de potássio e dissolver em água. Perfazer o volume até 150 mL.

Cloreto de ferro (0,1%)

Pesar 0,15 g de Ferrocianeto de potássio e dissolver em água. Perfazer o volume até 150 mL.