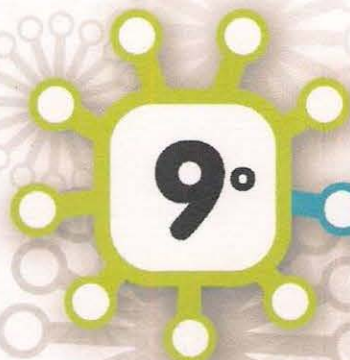


designarajlo



**ENCONTRO
QUÍMICA DOS
ALIMENTOS**

QUALIDADE E SUSTENTABILIDADE:
UMA ABORDAGEM INTEGRADA

ISBN : 978-989-20-1532-3

**Actas do 9º Encontro
de Química dos Alimentos**
29 de Abril » 2 de Maio 2009
Angra do Heroísmo | Açores | Portugal

designarajlo



ISBN : 978-989-20-1532-3

**Actas do 9º Encontro
de Química dos Alimentos**
29 de Abril » 2 de Maio 2009
Angra do Heroísmo | Açores | Portugal

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIFÚNGICA DE MÉIS ESCUROS E CLAROS DO NORDESTE DE PORTUGAL

Estevinho L.M.*, Pereira A. P., Morais M., Moreira L.L., Pereira J.A.

CIMO - Centro de Investigação de Montanha/Escola Superior Agrária de Bragança

Campus Santa Apolónia – Apartado 1172, 5301-855 Bragança

Tel. +351 273 303 200 Fax +351 273 325 405 e-mail: leticia@ipb.pt

Palavras-chave: mel; leveduras patogénicas; segurança microbiológica; caracterização físico-química; actividade antifúngica.

Resumo: O mel é consumido em larga escala no mundo inteiro e desempenha um papel importante na dieta humana, sendo também utilizado nas indústrias alimentar, farmacêutica e de cosméticos. A composição do mel é variável e depende da fonte floral usada na recolha do néctar, do clima, das condições ambientais e sazonais, bem como do manuseamento e do processamento. A qualidade do mel é determinada pelas suas propriedades sensoriais físicas e químicas.

Estas propriedades são avaliadas através de parâmetros estabelecidos na legislação.

Os objectivos deste trabalho foram a caracterização físico-química, microbiológica e polínica de dois tipos de méis, claro e escuro, produzidos na região de Trás-os-Montes (nordeste de Portugal). Avaliou-se ainda a sua actividade antifúngica em *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*.

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram os estabelecidos na norma do *Codex Alimentarius* e no Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro, e incluem pH, humidade, condutividade eléctrica, cinzas, acidez total, HMF (hidroximetilfurfural), índice diastásico, açúcares redutores e sacarose aparente. Todas as amostras analisadas respeitaram os limites legais estabelecidos, no entanto, observaram-se diferenças significativas entre os dois tipos de mel para todos os parâmetros determinados, excepto para o pH.

De um modo geral, todas as amostras analisadas evidenciaram níveis de segurança aceitáveis para o consumidor, com números reduzidos de microrganismos mesofílicos, bolores e leveduras, não tendo sido detectados esporos de clostrídios sulfito-redutores.

A análise polínica revelou que ambos os méis são monoflorais, sendo o pólen de *Erica sp.* o predominante nos méis escuros e o de *Lavandulla sp.* o mais abundante nos méis claros.

O crescimento de todas as leveduras estudadas foi afectado na presença de mel, sendo *C. neoformans* a levedura mais susceptível. Os méis escuros demonstraram maior actividade antifúngica.

1. INTRODUÇÃO

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. A composição do mel é variável e depende da fonte floral usada na recolha do néctar, do clima, das condições ambientais e sazonais, bem como do manuseamento e do processamento [1]. O mel contém cerca de duzentas substâncias, sendo as principais, os hidratos de carbono, e as secundárias, os minerais, proteínas, vitaminas, lípidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e outros fitoquímicos [1, 2]. A qualidade do mel é determinada pelas suas propriedades sensoriais, físicas e químicas. Estas propriedades são avaliadas através de parâmetros estabelecidos na norma do *Codex Alimentarius* e no Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro. As características físicas e químicas do mel conferem-lhe propriedades únicas como por exemplo, actividade antimicrobiana. Estudos sobre a actividade antibacteriana do mel têm vindo a ser desenvolvidos por muitos investigadores nomeadamente contra bactérias resistentes a antibióticos, bactérias patogénicas alimentares, bactérias de contaminação alimentar, entre outras [3, 4, 5].

A informação disponível sobre a capacidade do mel para inibir o crescimento de fungos é limitada. Foram, no entanto, publicados alguns estudos sobre a actividade antifúngica do mel, particularmente, contra isolados clínicos de *Candida sp.* [6, 7].

O objectivo deste estudo consistiu na caracterização físico-química, microbiológica e polínica de dez amostras de dois tipos diferentes de mel, claro e escuro, produzidos na região de Trás-os-Montes e a avaliação da actividade antifúngica contra os microrganismos, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Criptococcus neoformans*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Analisaram-se dez amostras de mel, cinco de cada tipo de mel, produzido no Nordeste de Portugal. As amostras foram adquiridas em explorações biológicas de produtores locais.

2.2. Análises microbiológicas

As amostras foram preparadas de acordo com as Normas Portuguesas NP-1829 (1982), NP-3005 (1985) e com a ISO 6887-1 (1999). Para avaliar a qualidade microbiológica das amostras de mel foram pesquisados microrganismos mesófilos totais em meio PCA (Plate Count Agar), leveduras e os bolores em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e, esporos de Clostrídios sulfito-redutores de acordo com a NP-2262 (1986).

2.3. Análises Físico-Químicas e Polínica

Para avaliar a qualidade físico-química das amostras de mel foram efectuadas as seguintes análises: humidade, HMF, índice diastásico de acordo com o método descrito em Anónimo [8]; Condutividade eléctrica e cinzas de acordo com o método descrito por Sancho [9]; pH, acidez total, teor açúcares redutores e a sacarose aparente de acordo com a metodologia descrita por Bogdanov [10]. A análise polínica das amostras foi determinada de acordo com o método acetolítico proposto por Anónimo [8].

2.4. Actividade antimicrobiana

As leveduras testadas foram: *Candida albicans* CECT 1394, *Candida krusei* ESA 11, *Criptococcus neoformans* ESA 3 e *Saccharomyces cerevisiae* ESA 1. Os microrganismos CECT foram adquiridos da Colecção Espanhol de Culturas Tipo da Universidade de Valência, enquanto os microrganismos ESA são isolados clínicos identificados no laboratório de microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança. A susceptibilidade dos microrganismos ao mel foi avaliada segundo o método de macrodiluição em caldo. Os valores da velocidade de crescimento foram obtidos por regressão linear na fase de crescimento exponencial, nos gráficos de densidade óptica a 640nm *versus* tempo de incubação. Determinaram-se ainda os valores de IC₅₀ (concentração de amostra necessária para inibir 50% do crescimento).

2.5. Análise estatística

Para cada tipo de mel, claro e escuro, foram analisadas cinco amostras, e cada parâmetro foi determinado em triplicado. Apresentam-se os valores médios e desvio padrão. Para cada parâmetro, as diferenças entre méis foram analisadas usando ANOVA e o teste de Tukey HSD com $\alpha=0,05$. Este tratamento foi realizado recorrendo ao programa SAS v.9.1.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise Microbiológica

Todos os parâmetros microbiológicos avaliados encontram-se abaixo do limite legal, sugerindo um alto padrão de qualidade dos méis claros e escuros da região de Trás-os-Montes. Tal facto está provavelmente associado à acidez total do mel e ao baixo teor de humidade, conjugado com o cumprimento das normas de segurança e higiene alimentar aquando da recolha e processamento do mel (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da análise microbiológica dos dois tipos de mel (ND – Não detectado).

| Unidades Formadoras de Colónias por grama (UFC/g) | | |
|---|---------------------------------------|-----------------------------------|
| | Mel Claro | Mel Escuro |
| Microrganismos mesofilos | $2.0 \times 10^2 \pm 1.0 \times 10^2$ | $7.2 \times 10 \pm 1.9 \times 10$ |
| Bolores e leveduras | $1.6 \times 10 \pm 0.9 \times 10$ | < 1.0 |
| Esporos de clostrídios sulfito-redutores | ND | ND |

3.2. Análise Físico-Química e Polínica

Relativamente à composição físico-química do mel, os resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados no mel claro e no mel escuro, apresentam-se na Tabela 2. Verificou-se que ambos os méis de Trás-os-Montes estão em conformidade com os valores estabelecidos na legislação Portuguesa (D.L. 214/2003), bem como, com a norma do *Codex Alimentarius*.

Tabela 2. Caracterização físico-química dos méis claros e escuros

| Parâmetros físico-químicos | Mel Claro | Mel Escuro |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Humidade (% w/w) | 17.125 ± 0.613 a | 15.575 ± 0.499 b |
| Condutividade (mS/cm) | 0.218 ± 0.382 b | 0.605 ± 0.078 a |
| Cinzas (% w/w) | 0.205 ± 0.033 b | 0.450 ± 0.054 a |
| pH | 3.763 ± 0.149 a | 4.378 ± 0.302 a |
| Acidez Total (meq/kg) | 40.450 ± 0.580 a | 27.050 ± 1.425 b |
| HMF (mg/kg) | 1.170 ± 0.280 a | 0.940 ± 0.249 b |
| Índice diastásico | 15.150 ± 0.870 b | 17.050 ± 1.047 a |
| Açúcares redutores (%) | 67.750 ± 0.500 b | 75.550 ± 0.614 a |
| Sacarose (%) | 7.875 ± 0.222 a | 2.750 ± 0.208 b |

Os pólenes identificados e a sua frequência no mel escuro e claro, apresentam-se na Tabela 3. As diferenças mais relevantes entre os dois tipos de méis são o tipo e a quantidade de pólenes. Ambos os méis são monoflorais, no entanto o mel escuro é mel monofloral de urze (percentagem de pólen de Erica superior a 45%), o mel claro é monofloral de rosmaninho (percentagem de pólen de Lavandula superior a 15%).

Tabela 3 – Análise polínica dos méis (ND – não detectado)

| Análise Polínica (%) | | |
|-----------------------|--------------------|--------------------|
| Espécies polínicas | Mel Claro | Mel Escuro |
| <i>Erica sp.</i> | ND b | 59.08 ± 1.40 a |
| <i>Lavandulla sp.</i> | 36.15 ± 1.04 a | 31.60 ± 1.78 b |
| <i>Prunus sp.</i> | 16.58 ± 0.87 a | 3.04 ± 0.80 b |
| <i>Echium sp.</i> | 26.55 ± 0.57 a | 6.10 ± 0.20 b |
| <i>Rubus sp.</i> | 20.53 ± 0.95 a | ND b |
| Outros | 1.19 ± 0.10 a | 0.20 ± 0.08 b |

3.3. Actividade Antimicrobiana

Os resultados para o IC₅₀ mostram que os méis escuros evidenciam uma actividade antimicrobiana superior à dos méis claros (Tabela 4). O mel claro e o mel escuro apresentaram capacidade antimicrobiana semelhante, sendo a *Candida krusei* e o *Cryptococcus neoformans* os microrganismos mais sensíveis. *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* foram moderadamente sensíveis ao mel, mas o mel escuro afectou mais o seu crescimento que o mel claro. A concentração necessária de mel escuro para inibir o crescimento microbiano é inferior à do mel claro, excepto para a *Candida krusei*.

Tabela 4 – Valores de concentração necessária para inibir 50 por cento do crescimento das leveduras.

| Microrganismos | IC ₅₀ dos méis (mg/mL) | |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------|
| | Mel Claro | Mel Escuro |
| <i>Candida albicans</i> | 1242 | 517 |
| <i>Candida krusei</i> | 101 | 131 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 168 | 1 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1947 | 474 |

Este estudo sugere que o mel da região de Trás-os-Montes é um mel de qualidade, e é uma boa fonte de agentes antifúngicos contra leveduras, responsáveis por algumas condições patogénicas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] - D. Arráez-Román, A.M. GómezCaravaca, M. Gómez-Romero, A. Segura-Carratero, A. Fernández-Gutiérrez - *Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*, J. Pharm. Biom. Anal., **41** (2006), 1648-1656. [2] - M.S. Finola, M.C. Lasagno, J.M. Marioli - *Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina*, Food Chem. **100** (2007), 1649-1653. [3] - L. Estevinho, A.P. Pereira, L. Moreira, L.G. Dias, E. Pereira - *Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey*. Food Chem. Toxicology, **46** (2008), 3774-3779. [4] - P.J.Taormina, B.A.Niemira, L.R. Beuchat - *Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power*. I. J. Food Microbiology, **69** (2001), 217-225. [5] - M.A.Mundo, O.I.Padilla-Zakour, R.W.Worobo - *Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys*. I. J. Food Microbiology, **97** (2004), 1-8. [6] - J.Irish, D.A.Carter, T.Shokohi, S.E. Blair. *Honey has an antifungal effect against Candida species*. Med. Mycology, **44** (2006), 289-291. [7] - Küçük, M., Kolaili, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F. - *Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia*. F. Chemistry, **100** (2007), 526-534. [8] - Anónimos (1986). *Métodos oficiales de análisis para la miel*. Orden de 12 de Junio de 1986 de la Presidencia del Gobierno, "Boletín Oficial del Estado" nº 145 de 18 de Junio de 1986. XXIII – Edulcorantes naturales y derivados. [9] - Sancho, M.T., Muniategui, S., Sánchez, P., Huidobro, J.F., Simal, J. - *Mieles del País Vasco, XI: Evaluación de los distintos tipos de cenizas*. Anales de Bromatología, **4** (1991), 311-324. [10] - Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C. - *Harmonised methods of the European Honey Commission*. Apidologie, **28** (1997), 1-59.