



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2016

Marcelino Inácio Caravela

**Caraterização Palinológica e Físico-química de
Méis da Serra do Buçaco.**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2016

Marcelino Inácio Caravela

**Caraterização Palinológica e Físico-química de
Méis da Serra do Buçaco.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada, realizada sob a orientação científica do Doutor Paulo Cardoso da Silveira, Professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, Doutor Paulo António Russo Almeida, Professor auxiliar do departamento de Zootecnia da Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro e Doutor Miguel Vilas Boas, Professor da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu filho Idimárcio Marcelino Caravela

O júri

Presidente	Professor Doutor Carlos Manuel Martins Santos Fonseca Professor associado com agregação do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro
Vogal – Arguente principal	Professor Doutor António Xavier de Barros e Cunha Pereira Coutinho Professor auxiliar do Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
Vogal - Co-orientador	Professor Doutor Paulo António Russo Almeida Professor auxiliar do Departamento de Zootecnia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro.

Agradecimentos

A minha querida mãe Vitória Tomani, meu primogénito filho Idimárcio Caravela e o meu Pai Inácio Caravela pela vontade que me deram de viver e trabalhar.

A todos *MozPeople* in Aveiro e em especial ao Mestrando Fidel Bilika por terem feito sentir-me em Moçambique enquanto estudava em Aveiro.

Aos meus colegas do laboratório Ana Carla e Tiago da UA, Andreia e Melissa do IPB, Idalina Abobeira e Carla Tomás da UTAD, pelo apoio técnico e convívio harmonioso que passamos.

À Associação dos Apicultores do Litoral Centro (AALC), pela disponibilização das amostras de méis analisadas neste estudo.

Com muito entusiasmo, aos meus orientadores da dissertação de Mestrado, Prof. Paulo Silveira, Prof. Paulo Russo e Prof. Miguel Vilas Boas a quem eu agradeço por todo empenho, disponibilidade, paciência, compreensão, dedicação e encorajamento,

Meu muito obrigado!

Noutamalelani!
Takomerwa maningue!

Resumo

No âmbito deste estudo caracterizaram-se do ponto de vista palinológico e físico-químico, e como forma de valorizar o mel da Serra do Buçaco, 10 amostras de méis da referida serra, que foram disponibilizadas pela Associação dos Apicultores do Litoral Centro. Com este objetivo, começou-se por elaborar uma palinoteca incluindo amostras de flores potencialmente melíferas, recolhidas na região. Posteriormente, estudou-se a origem botânica das amostras de mel, mediante a análise palinológica baseada nas metodologias de acetólise e contagens dos grãos de pólen e elementos de melada presentes no mel, com uso do microscópio ótico. Estudou-se, também, a qualidade dos méis mediante a análise de diversos parâmetros físico-químicos, tais como humidade, cor, condutividade elétrica, acidez, teor em hidroximetilfurfural (HMF), diástase, prolina, perfil em açúcares, fenóis totais, poder reductor, e a capacidade bloqueadora de radicais livres. Do ponto de vista polínico, foram encontradas cinco amostras de méis monoflorais de *Eucalyptus* e cinco multiflorais de *Eucalyptus* com outros *taxa*. Do ponto de vista qualitativo, verificou-se que cinco amostras eram de méis de néctar e as restantes eram de mistura de néctar com melada. Em termos de qualidade avaliada pelos parâmetros físico-químicos, todos estavam dentro dos limites legalmente estabelecidos, embora se tenha constatado um teor de HMF ligeiramente superior ao índice diastásico nas amostras de Miro, Mata do Buçaco e Lameira de São Pedro, o que indicia um possível início de degradação. O valor mais baixo de HMF foi constatado na amostra de Telhado e mais alto em Lameira de São Pedro. Em relação às propriedades antioxidantes, foram moderadas em todas as amostras. Constataram-se diferenças significativas entre os méis monoflorais de *Eucalyptus* e multiflorais deste com outros grupos taxonómicos para o pH ($t=-2.314$, $p<0.05$) e a maltulose ($t=-2.380$, $p<0.05$). A análise de agrupamentos, realizada com os parâmetros físico-químicos, permitiu distinguir dois grupos, um incluindo cinco amostras de méis monoflorais junto com uma multifloral (Telhado), e outro com quatro amostras multiflorais. Na ACP, o eixo 1 mostrou ser o mais relevante, separando, também, as mesmas cinco amostras de méis monoflorais, juntamente com a multifloral de Telhado, das restantes quatro amostras de méis multiflorais. Na ACP realizada com os dados polínicos ambos os eixos foram determinantes, separando o grupo de cinco amostras de méis monoflorais de quatro amostras multiflorais, destacando-se destas a amostra de Telhado, por ter uma composição polínica um pouco distinta.

Palavras-chave: mel, espectro polínico, caracterização físico-química, litoral centro, Buçaco.

Abstract

On the scope of this study 10 samples of honey provided by the Beekeepers Association of the Central Coast were subjected to a palynological and physico-chemical characterization, in order to valorize the honey of this mountain region. To achieve this, we started with the elaboration of a reference collection of pollen samples, including flowers potentially foraged by bees, from the study area. Afterwards, the botanical source of the honeys was inferred by counting pollen grains and honeydew elements under O.M., after applying the acetolysis method. The quality of the honey samples was also studied by analyzing several physico-chemical parameters including moisture content, color, electrical conductivity, pH, acidity, hydroxymethylfurfural content, diastase, proline, sugar profile, total phenols, reducing power and the blocking ability of free radicals (DPPH). Five of the samples were found to be of monofloral *Eucalyptus* honey, and the other five of multifloral honeys, although also including *Eucalyptus*. Also five samples were strictly of nectar honey, while the other five were of a mixture of nectar with honeydew. In terms of physico-chemical quality analysis, all the samples were found to be under the legally established limits, although a level of HMF slightly higher than the level of diastase was found in the Miro, Mata do Buçaco and Lameira de São Pedro samples, indicating a possible beginning of alteration of these samples. The lowest level of HMF was found in the Telhado sample, and the highest was found in the Lameira de São Pedro sample. The antioxidant properties were moderate in all the samples. Significant differences were found between monofloral *Eucalyptus* honeys and multifloral honey of this species among others for pH ($t=-2.314$, $p<0.05$) and maltulose ($t=-2.380$, $p<0.05$). The cluster analysis made with the physico-chemical parameters allowed to distinguish two groups, one including five monofloral samples and one multifloral (Telhado), and other group with the remaining four multifloral honeys. In the PCA, also conducted with the physico-chemical data, the axis 1 was the most relevant, splitting also the same five monofloral samples along with the multifloral sample from Telhado, from the remaining four multifloral samples. In the PCA conducted with the pollen data, both axis were important, splitting the five monofloral samples from four of the multifloral honeys. The multifloral sample from Telhado did not group with any of the other groups of samples, due to a slightly distinct pollen composition.

Keywords: honey, pollen spectrum, physico-chemical characterization, center coast, Buçaco.

Índice

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Âmbito e enquadramento	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1. A flora melífera e a sua importância.....	10
2.1.1 O Mel	11
2.1.1.1. Caracterização melissopalinológica	12
2.1.1.2. O mel de néctar e o espectro polínico	14
2.1.1.3. Composição e características físico-químicas de mel	15
2.1.1.3.1. Condutividade elétrica.....	16
2.1.1.3.2. A cor	17
2.1.1.3.3. Humidade	17
2.1.1.3.4. Perfil em açúcares.....	18
2.1.1.3.5. Acidez livre e lactónica	18
2.1.1.3.6. Hidroximetilfurfural - HMF	20
2.1.1.3.7. A prolina.....	20
2.1.1.3.8. Índice diastásico	21
2.1.1.3.9. Atividade antioxidante.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Área de estudo e amostragem	23
3.1.1 A Serra do Buçaco	24
3.1.1.2 Hidrografia.....	25
3.1.1.3 Geologia.....	25
3.1.1.4 Clima.....	25
3.1.1.5 Ocupação de solo	26
3.1.1.6 Flora e fauna	27
3.2 Procedimentos metodológicos	28
3.2.1 Caracterização melissopalinológica.....	28
3.2.2 Caracterização físico-química.....	30
3.2.2.1 Humidade.....	30
3.2.2.2 Cor	31
3.2.2.3 Condutividade elétrica	31

3.2.2.4	Acidez e pH	31
3.2.2.5	Hidroximetilfurfural – HMF	32
3.2.2.6	Índice diastásico	32
3.2.2.7	A prolina	33
3.2.2.8	Perfil em açúcares	33
3.2.2.9	Atividade antioxidante	35
3.2.2.9.1	Teor em fenóis totais	35
3.2.2.9.2	Efeito bloqueador de radicais livres	36
3.2.2.9.3	Poder redutor	37
3.2.3.	Análises estatísticas	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Análise melissopalínológica	40
4.1.2	Morfologia e diversidade polínica das espécies mais representativas	45
4.2	Análises físico-químicas	59
4.2.1	Humidade	59
4.2.2	Cor	60
4.2.3	Condutividade elétrica	60
4.2.4.	Acidez	62
4. 2. 5	HMF, índice diastásico e prolina	63
4. 2. 6	Perfil em açúcares	65
4. 2. 7	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	69
4.2.7.1	Fenóis totais	69
4.2.7.2	Efeito bloqueador de radicais livres	71
4.2.7.3	Poder redutor	73
4.3	Comparação dos parâmetros físico-químicos entre os méis monoflorais e multiflorais	74
4.3.1.	Agrupamentos das amostras de acordo com a semelhança físico-química.	75
4.3.2.	Contribuição dos parâmetros físico-químicos, vs espécies vegetais, na variação dos tipos de méis	78
5.	CONCLUSÕES	83
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Índice de Tabelas

Tabela I – Valores padrão da legislação internacional da qualidade do mel	16
Tabela II - Origem das amostras de mel estudadas. Em todas estas freguesias foi analisada uma amostra, tendo a cresta sido efetuada em julho de 2014.....	25
Tabela III – Intervalo de concentrações dos padrões de açúcares, suas retas e coeficientes de correlação.....	34
Tabela IV – Dados da análise polínica quantitativa de amostras de méis da Serra do Buçaco.	40
Tabela V – Espetro polínico de 10 amostras de méis da Serra do Buçaco.....	43
Tabela VI - Diversidade palinotaxonómica geral < 1% das 10 amostras de méis da Serra do Buçaco.	45
Tabela VII – Distribuição e abundância de pólen de plantas melíferas na Serra do Buçaco, cresta de julho de 2014.	58
Tabela VIII – Valores dos parâmetros físico-químicos: humidade, cor e a condutividade elétrica de méis da Serra do Buçaco.	61
Tabela IX – Valores dos parâmetros físico-químicos relacionados com a acidez: pH, acidez livre a pH 7, acidez livre a pH 8,3, acidez lactónica e acidez total, dos méis da Serra do Buçaco.....	63
Tabela X – Valores dos parâmetros de qualidade do mel da Serra do Buçaco: hidroximetilfurfural, índice diastásico e prolina.....	64
Tabela XI– Alguns indicadores para avaliar a dinâmica de cristalização do mel.	67
Tabela XII – Valores de perfil em açúcares de méis da Serra do Buçaco, obtido por cromatografia líquida em HPLC. Resultados expressos em %, equivalentes a g/100g de mel	68
Tabela XIII – Valores de indicadores de atividade antioxidante de méis da Serra do Buçaco, fenóis totais, capacidade bloqueadora de radicais livres e poder redutor.....	69
Tabela XIV – Diferenças estatísticas de Parâmetros físico-químicos entre as amostras monoflorais e multiflorais de méis da Serra do Buçaco.	75
Tabela XV– Resultados da ACP realizada com 16 variáveis físico-químicas e 10 amostras de mel. Valores próprios, percentagem da variância explicada por cada eixo e percentagem de variância cumulativa explicada para os três eixos.....	80

Tabela XVI – Resultados da ACP realizada com 22 tipos polínicos e 10 amostras de mel. Valores próprios, percentagem da variância explicada por cada eixo e percentagem de variância cumulativa explicada para os três eixos..... 80

Índice de Figuras

Figura 1 – Composição química do mel, segundo Serra (s.d).....	15
Figura 2 – Mapa da área envolvente da Serra do Buçaco, com indicação das freguesias de origem das amostras (círculos negros) e respetivos municípios (círculos azuis). Adaptado de SNIG, 2015.	23
Figura 3 – Redução do DPPH na presença de um átomo de hidrogénio.....	36
Figura 4 – Equação de redução do complexo Fe ³⁺ /ferrocianeto à sua forma ferrosa (Berker et al., 2007).	37
Figura 5 – A, B – <i>Eucalyptus globulus</i> (A – vista polar, B – pormenor da abertura e superfície da exina); – C, D – <i>Rhamnus alaternus</i> (C – vista equatorial e pormenor das aberturas; D – pormenor da superfície da exina); E, F – <i>Castanea sativa</i> (E – vista equatorial; F – Pormenor da exina).	49
Figura 6 – G, H – <i>Rubus ulmifolius</i> (G – vista equatorial; H – pormenor da exina e abertura); I, J – <i>Salix</i> spp. (I – vista equatorial e pormenor da abertura e da exina); K, L – <i>Trifolium repens</i> (K – vista equatorial; L – pormenor da superfície da exina e abertura).	50
Figura 7 – M, N – Tipo <i>Raphanus raphanistrum</i> (M – vista polar e pormenor da abertura; N – pormenor da superfície da exina); O, P – <i>Prunus persica</i> (O – vista equatorial; P – pormenor da abertura e superfície da exina); Q, R – <i>Quercus robur</i> (Q – vista equatorial; R – pormenor da superfície da exina).	51
Figura 8 – S, T – <i>Erica umbellata</i> (S – vista equatorial; T – pormenor da abertura e ornamentação da exina); U, V – <i>Echium plantagineum</i> (U – vista equatorial; V – pormenor da abertura e ornamentação da exina); W, X – <i>Cytisus striatus</i> (W – vista equatorial; X – pormenor da abertura e ornamentação da exina).	52
Figura 9 – A – <i>Eucalyptus globulus</i> (vista polar); B – <i>Rhamnus alaternus</i> (vista equatorial); C – <i>Castanea sativa</i> (Vista equatorial); D – <i>Rubus ulmifolius</i> (vista equatorial); E – <i>Salix</i> spp. (Vista equatorial e colpo pormenorizado), F – <i>Trifolium repens</i>	

(vista equatorial e colpo pormenorizado); G – <i>Raphanus raphanistrum</i> (vista polar); H – <i>Echium plantagineum</i> (vista equatorial). Ampliação – A a H (100x).....	53
Figura 10 – I – <i>Prunus persica</i> (vista polar); J – <i>Quercus robur</i> (vista equatorial); K – <i>Erica umbellata</i> (vista equatorial). Ampliação – I a K (100x).....	54
Figura 11 – A, B – <i>Aesculus hippocastanum</i> (A – vista quatorial; B – vista polar); C, D – <i>Sedum</i> spp. (C – vista equatorial e ornamentação da exina; D – vista polar e aberturas); E – Tipo A 19 (vista equatorial); F – <i>Acacia melanoxilon</i> (vista equatorial); G, H – <i>Oenanthe crocata</i> (G – vista equatorial; H – Vista polar); I, J – <i>Lythrum</i> spp. (I – vista equatorial; J – vista polar). Ampliação – F – (40x) e A, B, C, D, E, G, H, I, J – (100x).....	55
Figura 12 – K, L – <i>Pterospartum tridentatum</i> (K – vista equatorial; L – vista polar); M, N – <i>Hedera</i> spp. – (M – vista equatorial e ornamentação da exina; N – vista polar); O, P <i>Malus</i> spp.– (O – vista equatorial; P – vista polar); – Q, R – <i>Genista</i> spp. – (Q – vista equatorial; R – vista polar) Ampliação – K a R – (100x).....	56
Figura 13 – S, T – <i>Crataegus monogyna</i> – (S – vista equatorial; T – vista polar), U, V – <i>Cistus</i> spp. – (U – vista equatorial; V – vista semi-polar). Ampliação – S a V – (100x).....	57
Figura 14 – Perfil de açúcares pela cromatografia líquida por HPLC ilustrando os 7 padrões de açúcares e os respetivos açúcares obtidos com exceção da sacarose, para o mel da Serra do Buçaco. A -Frutose, B - Glucose, C – Sacarose, D – Turanose, E – Maltulose, F - Maltose e G - Trealose.....	66
Figura 15 – Cristalização parcial de méis da Serra do Buçaco, observação de 2015 e 2016.	67
Figura 16 – Reta de calibração para o padrão ácido gálico.	70
Figura 17 – Teor em fenóis totais nos méis da Mata do Buçaco.....	71
Figura 18 – Valores de EC ₅₀ das amostras de méis da Serra do Buçaco.....	72
Figura 19 – Potencial redutor das amostras de mel da Serra do Buçaco.....	73
Figura 20 – Dendograma da similaridade dos méis das regiões da Serra do Buçaco de acordo com as propriedades físico-químicas, pelo método de ligação completa.....	77
Figura 21 – ACP dos dados físico-químicos vs amostras de mel.....	79
Figura 22 – ACP dos dados melissopalínológicos vs amostras de mel.	79

Índice de anexos

Anexo I – Teste de normalidade dos dados.....	94
Anexo II – Correlação entre as variáveis físico-químicas iniciais e as componentes principais.....	95
Anexo III – Correlação entre as variáveis melissopalínológicas iniciais e as componentes principais.....	96
Anexo IV – Parâmetros físico-químicos medidos para cada amostra de mel da Serra do Buçaco (cresta de julho de 2014).....	97

Lista de abreviaturas e símbolos

HMF – hidroximetilfurfural

P – significância estatística

t – teste estatístico *t* e ou teste *t*-student

T – teste estatístico de Mann-whitney

ACP – avaliação de componentes principais

M.O – microscópio ótico

MEV – microscopio eletrônico de varrimento

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

s.d – sem data

meqkg – milequivalentes por kilograma

mgkg – miligramas por kilograma

mgg – miligramas por gramas

mgml – miligramas por mililitros

mgGAeg – miligramas por unidades equivalentes de ácido gálico

DN – unidades de índice diastásico na escala de schade

SNIG – sistema nacional de informação geográfica

EM – elementos de melada

GP – grãos de pólen

IR – índice de refração

EC₅₀ – capacidade que a amostra tem em bloquear 50% de radicais livres

P – eixo polar

E – eixo equatorial

PC1 – componentes principais, eixo um

PC2 – componentes principais, eixo dois

PC3 - componentes principais, eixo três

1. INTRODUÇÃO

1.1. Âmbito e enquadramento

O Mel é um produto alimentar, que já era consumido pelo homem muito antes do surgimento da apicultura e que resulta do processamento, pela *Apis mellifera*, do néctar das flores recolhido durante a polinização e da melada das secreções de partes vivas das plantas (Peréz, 2003). A sua qualidade, medida através da composição polínica e das características físico-químicas, depende fundamentalmente da origem floral (Silva *et al.*, 2004). Por isso, o conhecimento real da sua composição é de extrema importância porque define o preço no mercado (Oroian., 2015) mas também, permite ao consumidor, escolher o produto apropriado às suas necessidades alimentares e pagar uma percentagem a mais caso haja na embalagem um rótulo de qualidade certificada (Padilla *et al.*, 2007). Além disso, uma rotulagem incompleta ou incorreta põe em causa o direito do consumidor visto que, nos últimos anos os consumidores perderam confiança em relação à qualidade dos produtos alimentares como consequência de numerosos escândalos e crises que afetaram a indústria alimentar (Padilla *et al.*, 2007). Por estas razões e dúvidas, considerou-se que esta pesquisa seria útil e que permitiria aprofundar bastante sobre a qualidade e origem botânica dos méis analisados.

O Mel é definido como uma substância naturalmente açucarada, produzida pela abelha *Apis mellifera* L. a partir de néctar das flores, ou das secreções oriundas de partes vivas de plantas, ou de excreções de insetos sugadores de plantas (como os hemípteros), que as abelhas recolhem, convertem, juntam com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia (Diretiva 2001/110/CE, 2001). É no mesmo mel que se encontra uma diversidade de componentes físico-químicos tais como: a frutose, glucose, maltose e sacarose como os hidratos de carbono mais abundantes (Erejuwa *et al.*, 2012a). Também se encontram outros açúcares em menor concentração, referidos mais adiante neste trabalho. Outros componentes tais como: água, ácidos orgânicos, proteínas, vitaminas, minerais, fenóis, flavonoides, enzimas entre outras substâncias não mencionadas aqui, também são encontradas (White & Doner, 1980; Erejuwa *et al.*, 2012b). Das propriedades físicas, as mais importantes e comumente analisadas no mel destaca-se a cor e a condutividade elétrica, mas também a densidade, índice de refração, viscosidade, cristalização, entre outras, têm sido estudadas (Louveaux *et al.*, 1970; Ohe *et al.*, 2004). Todos estes parâmetros permitem avaliar o

estado de conservação do mel (Anklam, 1998), bem como as suas propriedades nutricionais e bioativas, anti-histamínicas, antibacterianas, anti-inflamatórias, antivirais, bem como antioxidantes, que interferem no combate ao “stress oxidativo” e minimizam o risco de doenças (Perron & Brumaghim, 2009; Yuksel *et al.*, 2010). Por sua vez, a análise melissopalínológica é o principal método usado para avaliar a origem botânica e por conseguinte a origem geográfica dos méis (Louveaux *et al.*, 1970; Ohe *et al.*, 2004). Daí que, pretende-se também verificar se realmente todas amostras recolhidas refletem a informação patente nos seus rótulos.

Neste estudo foram analisadas amostras de mel originárias de 10 áreas diferentes, de apiários localizados ao longo da Serra do Buçaco, as quais foram fornecidas pela Associação dos Apicultores do Litoral Centro, originalmente rotuladas como méis multiflorais. As análises físico-químicas foram realizadas nos laboratórios do Instituto politécnico de Bragança – IPB, enquanto as análises palinológicas, foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Para este último efeito, realizou-se, antecipadamente, uma recolha de flores da área de estudo, com vista à preparação de uma palinoteca de referência que serviu de guia para a comparação com o espectro polínico presente nas amostras de mel. Neste trabalho pretendemos avaliar a “qualidade” das amostras estudadas e a fidedignidade da informação patente nos respetivos rótulos. Para tal, foram traçados os seguintes objetivos específicos: analisar o espectro polínico e os elementos de melada a fim de inferir sobre a origem botânica das amostras; do ponto de vista físico-químico, determinar a humidade, a cor, a condutividade elétrica, o pH, a acidez, o teor em hidroximetilfurfural - (HMF), o perfil em açúcares, e o índice diastásico; bem como as propriedades antioxidantes mediante a análise do poder redutor, dos fenóis totais, e da capacidade bloqueadora de radicais livres. Finalmente, uma análise estatística foi efetuada com os dados obtidos com o intuito de investigar a existência de diferenças significativas entre as médias dos parâmetros físico-químicos em relação à origem botânica e ou geográfica dos méis estudados e adicionalmente, fizeram-se análises multivariadas pelos métodos de agrupamento e de análises de componentes principais para compreender os níveis de similaridade entre as amostras bem como as respetivas medidas dos parâmetros físico-químicos em relação à origem botânica dos mesmos méis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A flora melífera e a sua importância

A biodiversidade vegetal é um recurso bastante valioso para a atividade apícola uma vez que constitui o sustento alimentar das abelhas (Steffan-Dewenter & Tschardt, 2000). Para os apicultores, o conhecimento desta diversidade vegetal, sua utilidade, distribuição geográfica e fenologia, constitui um instrumento fundamental, porque ajuda a decidir o manejo temporal e espacial durante a gestão das colmeias a fim de aumentar a produção de mel, e também ajuda a planejar a implantação em áreas apícolas de culturas vegetais que possam disponibilizar o pólen e o néctar, direcionando projetos de recomposição vegetal, reflorestamento de áreas de conservação e implantação de corredores ecológicos (Román & Palma, 2007; Modro *et al.*, 2011). Ademais, a certificação da origem botânica e geográfica do mel, *i.e.* a identificação dos vários tipos de pólen no mel para avaliar a importância relativa de cada uma das plantas visitadas como fornecedora de néctar ou do pólen, está relacionado com o tipo de flora melífera nas proximidades dos apiários (Santos, 1964; Louveaux *et al.*, 1970).

Nem todas as plantas existentes nos habitats contribuem com iguais recursos para a formação do mel, pois vários estudos feitos em amostras de méis indicam certas famílias e géneros botânicos específicos como potenciais contribuidoras para a formação do mel. Portanto, do ponto de vista melífero, e quanto a oferta de recursos, a flora pode ser classificada em três seguintes grupos: nectarífera, polinífera e polinífera-nectarífera (Barth, 2005; Gutiérrez & García, 2007). Em 38 amostras de mel estudadas, da região de Luso, Portugal, foi possível identificar os seguintes grupos taxonómicos: *Eucalyptus*, *Erica arborea*, *Rubus ulmifolius*, *Castanea sativa*, *Raphanus raphanistrum*, *Echium plantagineum*, *Cytisus scoparius*, *Lavandula* sp., *Trifolium hybridum*, *Rhamnus* sp. (Silva *et al.*, 2009). Além disso, na região de Trás-os-montes e Alto Douro, verificou-se a predominância de pólenes das Rosaceae (34,1%), composto, neste caso, pelos géneros *Rubus* e *Prunus*, seguidos de 20,8% da família Fabaceae (*Medicago* sp. e *Trifolium* sp.). Também dominaram em cerca de 12,4%, 7,9 7,5% e 6,5%, respetivamente, as famílias Fagaceae (*Quercus* sp. e *Castanea sativa*), Boraginaceae (*Echium* sp. e *Achusa* sp.), Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis* e *Lavandula pedunculata*) e Ericaceae. Além destas, outras famílias foram encontradas, mas em proporções relativamente baixas (Pires *et al.*, 2004).

As Cistaceae, por vezes, têm sido predominantes em amostras de mel, pois um estudo feito no Parque Arqueológico do vale de Côa mostrou que esta é uma das famílias que aparece com uma representação considerável, com destaque para as espécies *Halimimum halimifolium* e *Cistus albidus* (Maia *et al.*, 2002). Porém, um estudo levado a cabo na região portuguesa Entre-Douro e Minho mostra claramente a predominância de pólen do tipo *Eucalyptus* (Mirtaceae), com mais de 70% em cinco amostras das 31 estudadas, seguido do tipo *Citrus* (Rutaceae), com cerca de 10%, encontrada em apenas uma amostra do mesmo universo e as restantes 24 amostras sendo de méis multiflorais. Estas últimas incluíram os géneros *Rubus*, *Erica*, *Trifolium*, *Cistus*, *Echium*, *Pinus*, *Prunus*, *Citysus*, *Medicago*, *Genista*, *Lotus*, *Quercus*, *Acacia*, *Castanea*, *Pterospartum*, *Malus*, *Tilia*, *Brassica*, *Diploaxis*, *Lavandula* e *Pyrus*. As famílias Fabaceae e Rosaceae, foram as que providenciaram maior número de tipos polínicos devido a participação com maior número de *taxa* relativamente às outras famílias (Feás *et al.*, 2010).

Portanto, a enorme diversidade florística existente nos ecossistemas naturais e semi-naturais vai determinar as características físico-químicas e o espectro polínico dos méis, por isso, o conhecimento prévio da flora local é essencial para o estudo melissopalínológico das amostras de mel.

2.1.1 O Mel

Os dados que confirmam o uso antigo do mel são bastante abundantes e mostram que em todas as culturas humanas existe o domínio das habilidades de recolha e uso do mel (Pérez, 2003).

Em África, por exemplo em Moçambique, o mel é usado como alimento, ainda hoje extraído diretamente das colmeias nas árvores usando o fumo resultante da combustão lenta de palhas secas das savanas, que afugenta as abelhas.

A Península Ibérica aparece como um dos grandes exemplos mais antigos pois, existem retratos de pinturas rupestres em cavernas em Valência, datado do paleolítico superior (de há 35000 anos), ilustrando uma mulher ‘Man of Bicorn’ envolvida por um conjunto de abelhas pendurada numa árvore, enchendo a sua cesta de favos de mel (Pérez, 2003).

Na antiga Grécia, o mel era respeitado como alimento divino, cumprindo uma função religiosa fundamental, pois acreditava-se que o néctar que as abelhas libam para gerar o mel caía do céu. Ao contrário dos gregos, os egípcios estavam convencidos sobre

a importância do mel na sua mitologia, pois o mel era símbolo de fertilidade e da vida e as abelhas foram na primeira dinastia consideradas como símbolo de rei. Todavia, os romanos aproveitavam o mel como adoçante e fabricavam o vinho e a cerveja e usavam-no, ainda, como conservante para seus alimentos (Pérez, 2003).

Enquanto para os romanos a procura do mel ultrapassou a produção e, por isso, já praticavam uma verdadeira apicultura, na região nortenha europeia reinava a recolha do mel silvestre. Portanto, com a decaída da civilização romana, constata-se um longo período sem atividade apícola e com piores momentos no século XVIII, pois foi importado da América o açúcar de cana como adoçante. Mais tarde, a apicultura renasceu e evoluiu, desde a extração natural até a construção de colmeias fechadas com peças de madeira. Em 1865, o italiano Huruschka expôs um modesto aparelho e que através de uma manivela centrifugava um único favo de mel (Pérez, 2003).

2.1.1.1. Caracterização melissopalínológica

A melissopalínologia, como ciência, teve o seu início com o trabalho de Pfister em 1895, ao argumentar a possível determinação da origem botânica e ou geográfica do mel através da quantificação de grãos de pólen existentes na amostra. A partir daí, a utilização da microscopia no estudo das amostras de mel ganha a sua importância em várias partes do mundo com a finalidade de se compreender a relação existente entre as plantas e as abelhas, que é muito importante para a prática apícola e estratégias de polinização (Valencia *et al*). Isto, provavelmente, deveu-se a existência de fraudes na comercialização do mel e da própria necessidade em saber a origem botânica e ou geográfica (Pérez, 2003).

Em 1908 Young e 1911 Fehlman, desenvolveram, respetivamente, nos Estados Unidos da América e Suíça, estudos relacionados, onde este último veio a demonstrar a distinção entre mel de melada e mel de néctar. Durante este período, em muitos países da Europa fizeram-se muitos trabalhos nesta área e em 1945 a melissopalínologia ganhou autonomia como ramo distinto da palínologia (Pérez, 2003).

Os problemas específicos da melissopalínologia compreendem: a determinação do conteúdo sedimentar melífero “análise qualitativa e quantitativa dos vários elementos que compõe a amostra entre pólen e elementos de melada”, para se inferir sobre a origem geográfica e botânica do mel (Louveaux *et al*, 1978). Portanto, com o aumento de padrão de vida na atualidade e uma atenção acrescida em produtos resultantes de serviços dos

ecossistemas, com efeitos positivos para a saúde humana, constata-se uma crescente ingestão de mel, principalmente em países industrializados (Gomes, 2009). Por estes motivos, hoje ocorre um aumento da atividade apícola e investigação no campo da melissopalínologia.

A análise do espectro polínico do mel permite deduzir a sua origem floral e certifica a identidade da génese do mel apontada pelos apicultores (Iglesias *et al.*, 2012).

O mel contém, para além de grãos de pólen, partículas microscópicas, tais como esporos de algas e fungos, provenientes das plantas de onde o néctar ou melada tenham sido recolhidos pelas abelhas. Por isso, importa fazer a análise quantitativa das amostras, a fim de verificar se se trata de mel ou melada. Para o efeito, faz-se a contagem em 100 campos óticos, de entre 10 a 20 elementos, para totalizar, no mínimo, 500 elementos de pólen, esporos de fungos e algas e determina-se a proporção relativa. Depois, faz-se a análise qualitativa onde os grãos de pólen são identificados por microscopia ótica em um sedimento previamente preparado por centrifugação do mel diluído (Ohe *et al.*, 2004).

Para que seja de maior rigor, contam-se 500 a 1000 grãos, e determina-se posteriormente a frequência relativa da diversidade polínica (Ohe *et al.*, 2004). Com isso, a espécie de planta que tiver maior frequência polínica será considerada a de maior contribuição para a produção do mel e, acima de uma determinada percentagem pode levar à classificação desse mel como monofloral, em oposição a multifloral, quando nenhuma espécie é predominante.

Na realidade, não existe de uma forma absoluta mel monofloral, visto que as abelhas não visitam uma única espécie vegetal, mesmo se esta for a dominante. Assim, para que o mel seja considerado monofloral, a amostra deve conter pelo menos 45% do pólen correspondente a espécie em causa. Infelizmente, a quantidade de pólen em relação ao néctar varia consideravelmente entre diferentes espécies de plantas (Bryant & Jone, 2001).

Efetivamente, algumas formas polínicas são conhecidas como sendo sobre-representadas enquanto outras são sub-representadas, podendo a percentagem necessária para considerar o mel monofloral ser diferente da indicada, tal como vai ser abordado no capítulo seguinte (Bryant & Jone, 2001).

Em relação ao mel de melada, este não contém qualquer pólen específico, mas pólen transportado pelo ar e que acaba ficando preso na pegajosa melada. Os fatores morfológicos e fisiológicos das plantas, bem como o comportamento das abelhas na busca do pólen e processos internos de transferência do mesmo na colmeia, que culmina com a contaminação e mesmo a contaminação pelo apicultor durante o manuseio, podem influenciar a representação polínica em amostras de mel no geral (Bryant & Jone, 2001; Pérez, 2003). Contudo, a composição polínica da amostra de mel reflete em geral, o tipo de vegetação de onde o mel foi produzido e é útil para a determinação da origem botânica e geográfica (Louveaux *et al.*, 1978).

2.1.1.2. O mel de néctar e o espectro polínico

As flores oferecem qualidades específicas ao mel de néctar (aroma, concentração e tipos de açúcares, tipos de pólen, acidez entre outros componentes) porque, néctares de plantas diferentes apresentam qualidades peculiares. Por sua vez, esta peculiaridade vai determinar divergências nas propriedades físico-químicas entre amostras de diferentes méis. Nestes, dominam pólen de espécie nectaríferas contudo, em função das frequências relativas dos tipos polínicos, vão ocorrer méis monoflorais e multiflorais (Pérez, 2003). A sua classificação em monofloral depende da presença de 45% do pólen da mesma espécie em relação ao universo total polínico (Louveaux *et al.*, 1978; Ohe *et al.*, 2004).

O desequilíbrio entre a taxa de produção de pólen e a de néctar em certas espécies vegetais, provoca muitas exceções como na família Lamiaceae e género *Citrus* onde o pólen está sub-representado no mel de tal forma que 10-20% são suficientes para receber a classificação monofloral, crescendo para os 20 e 30% nos géneros *Tilia*, *Medicago*, *Robinia* e na família Cucurbitaceae (Pérez, 2003).

Em plantas com altas taxas de produção polínica, em que o pólen aparece hiper-representado em relação ao néctar como acontece nos géneros *Lotus*, *Eucalyptus* e *Castanea*, as percentagens acordadas são bastante elevadas oscilando entre 70% e 90% (Pérez, 2003) e em especial 90% para a *Castanea sativa* (Louveaux *et al.*, 1970).

No entanto, é importante perceber que para uma boa certificação da origem botânica a análise do perfil polínico não tem sido a única análise efetuada, pois são também incorporados e cruzados os parâmetros sensoriais e físicos-químicos (Ruoff, 2006).

2.1.1.3. Composição e características físico-químicas de mel

Segundo Serra (s.d.), a composição do mel obedece ao padrão geral apresentado na Figura 1, embora esta seja mais complexa, pois dela fazem parte 180 componentes diferentes, dos quais alguns deles serão aqui analisados.

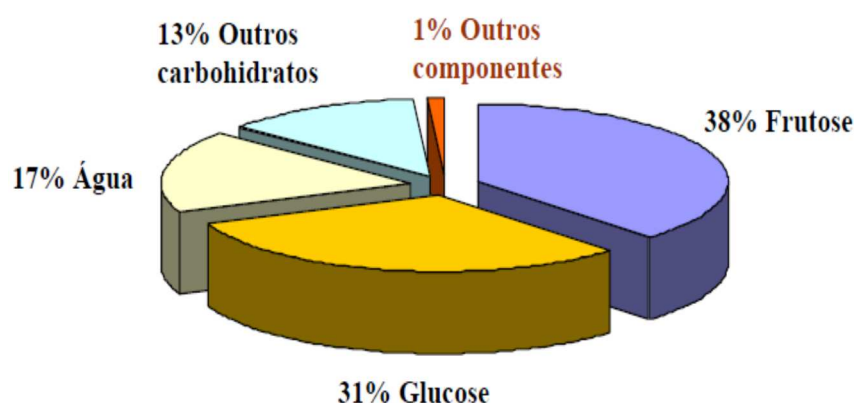


Figura 1 – Composição química do mel, segundo Serra (s.d).

Durante as análises feitas ao mel deve-se ter em conta que, para além do tipo de flora melífera, fatores como o clima da região e sazonalidade, estágio de maturação, processamento e armazenamento interferem na sua qualidade (Silva *et al.*, 2004). Mas também, as transformações irreversíveis de carácter químico e biológico como o envelhecimento, tratamento térmico, adição de produtos que chegam a alterar o valor nutritivo e propriedades organoléticas, podem ser responsáveis pela sua alteração (Pérez, 2003).

Do ponto de vista físico, características como o índice de refração, densidade, viscosidade, poder refratário, condutividade, calor específico, cristalização, higroscopicidade, tensão superficial, propriedades coloidais e colorimétricas, costumam ser analisadas no mel (Pérez, 2003; White & Doner, 1980), as quais se devem a concentração de diversos hidratos de carbono que se encontram em diferentes proporções entre os méis (Pérez, 2003). Ademais, a cor, sabor e o aroma também caracterizam o mel e variam em função da fonte floral (White & Doner, 1980).

Do ponto de vista químico o mel caracteriza-se por ser constituído, essencialmente, por açúcares, sendo a glicose e frutose os monossacarídeos mais predominantes, além disso, existem também pigmentos carotenoides, compostos

fenólicos como os flavonoides, compostos aminados (aminoácidos, alcaloides e aminas) e ácido ascórbico, para além de teores em ácidos orgânicos, enzimas, partículas sólidas oriundas da sua colheita, proteínas e substâncias minerais (Diretiva 2001/110/CE, 2001; Ferreira, 2008; Perez-Aquillue *et al.*, 1994; Pérez, 2003; Soler *et al.*, 1995).

Na Tabela I descrevem-se, detalhadamente, as características físico-químicas comumente analisadas, com os valores de referência, com base na legislação internacional, relativa à qualidade do mel. Alguns parâmetros que serão analisados, não constam na legislação internacional, mas, ainda assim, são muito importantes.

Tabela I – Valores padrão da legislação internacional da qualidade do mel.

Parâmetros	Valor padrão	Fontes
Humidade	≤ 20% Exceto <i>Calluna vulgaris</i> . ≤ 23%	
Condutividade Elétrica	Máximo ≤ 0,8 mScm ⁻¹ Mínimo ≥ 0,8 mScm ⁻¹ - mel melada e <i>Castanea sativa</i> . Exceto <i>Arbutus unedo</i> , <i>Erica</i> spp., <i>Eucalyptus</i> spp., <i>Tilia</i> spp., <i>Calluna vulgaris</i> , <i>Lepdospermum</i> e <i>Melaleuca</i> spp.	
Teor de Frutose+Glucose	Mel de néctar ≥ 60% Mel de melada e sua mistura com mel de néctar ≥ 45%	
Teor de sacarose	No geral ≤ 5% Exceto <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Banksia menziesii</i> , <i>Hedysarum</i> , <i>Eucalyptus camaldulensis</i> ; <i>Eucryphia</i> spp., <i>citrus</i> spp. ≤ 10 % Exceto <i>Lavandula</i> spp., <i>Borago officinalis</i> ≤ 15%	DL.126-2015
Acidez livre	Máximo ≤ 50 meqkg ⁻¹	
HMF	Máximo geral ≤ 40 mgkg ⁻¹ Para méis da região tropical ≤ 80 mgkg ⁻¹	
Índice diastático (DN)	Méis Analisados após o tratamento e mistura ≥ 8 Méis com baixo conteúdo natural de enzimas ≥ 3	
Prolina	No geral ≥ 180 mgkg ⁻¹	(IHC, 2009)

2.1.1.3.1. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica de um determinado material é tanto maior, quanto melhor ele permitir passar por si a corrente elétrica (Bagnato & Rodrigues, 2006). Em amostras de mel, o valor da condutividade elétrica depende do conteúdo mineral bem como das proteínas e ácidos orgânicos lá existentes (Gomes *et al.*, 2011; Pérez, 2003). As medidas de condutividade elétrica dão uma indicação do teor de todas as substâncias orgânicas e

inorgânicas ionizáveis presentes no mel (Gomes *et al.*, 2011). Contudo, em função da origem floral a condutividade elétrica em amostras de méis variam entre grandes extremos, sendo que os méis mais escuros e os de melada conduzem mais a corrente elétrica do que os méis florais mais claros (Pérez, 2003).

Os critérios de composição de méis em uso na Europa exigem que o mel, quando usado em qualquer produto destinado ao consumo humano, se for de nectar deve ter, no máximo, 0,8 mS/cm, exceto quando seja de melada ou de flores de castanheiro e misturas desses méis, em que deve ter no mínimo, 0,8 mS/cm (Diretiva 2001/110/CE, 2001).

2.1.1.3.2. A cor

A cor do mel representa uma das características organolépticas mais importantes de tal forma que determina a qualificação do tipo de mel pelo apicultor. Normalmente, o mel apresenta tonalidades de cor âmbar mas a sua variação vai desde amarelo pálido, branco próximo a transparente até escuro próximo a negro, principalmente os multiflorais mas, entre esta faixa, passa por uma gama de variações de cores como vermelho e castanho (Negueruela & Perez-Arquillue, 2000; Pérez, 2003).

Geralmente méis mais claros contêm menos matéria mineral em relação a méis escuros e esta variação dependerá de nutrientes absorvidos pela planta, sua disponibilidade no solo, bem como da contaminação ambiental e do solo. Ademais, a cor, através da sua aparência, é um critério usado como grau de aceitabilidade, daí que esta deve estar dentro de um intervalo previsto para a aceitação do mel pelo consumidor (Sanz *et al.*, 2005).

2.1.1.3.3. Humidade

Depois da frutose e glucose, a água representa o terceiro maior componente quantitativo do mel e em geral varia desde 12,2 a 22,9% (Ball, 2007). Mas, outros estudos apontam uma variação na ordem dos 13 a 25% (White & Doner, 1980). Esta variação depende da humidade ambiental e edáfica da área geográfica, abundância da fonte do néctar, da flora, bem como as práticas no manuseamento apícola (Pérez, 2003). Ainda assim, é considerada a humidade natural desse produto nos favos a que sobra do néctar após a sua transformação em mel (White & Doner., 1980). Portanto, o teor de água no mel, ao influenciar a sua maturidade, conservação, sabor, peso específico, cristalização e viscosidade é uma das características verdadeiramente importante (Pérez, 2003).

Quando o mel é comercializado em estado natural ou utilizado em qualquer produto destinado ao consumo humano, este deve, em geral, conter no máximo 20% de teor de água mas, para méis de urze (*Calluna*) e mel para uso industrial em geral deve conter no máximo 23% e de urze (*Calluna*) para uso industrial pode conter no máximo 25% (Diretiva 2001/110/CE, 2001).

2.1.1.3.4. Perfil em açúcares

Cerca de 95 a 99,9% da matéria seca do mel é constituído por hidratos de carbono, o que lhe confere alta viscosidade, densidade, tendência para absorção de humidade e granulação, bem como resistência perante certos tipos de deterioração (White & Doner, 1980). Todavia, os monossacarídeos frutose e glicose aparecem a perfazer cerca de 85% dos sólidos e são considerados os principais açúcares no mel sendo a frutose em geral, mais abundante que a glicose (White & Doner, 1980; Perez, 2003). Para além destes açúcares, já foram encontrados no mel mais de 22 açúcares mais complexos que a frutose e glicose, dos quais 10 são dissacarídeos (White & Doner, 1980), onde a sacarose e a maltose fazem parte e representam cerca de 10% da totalidade dos açúcares no mel (Perez, 2003) e outros 10 são trissacarídeos e mais 2 açúcares complexos diferentes, a isomaltotetraose e isomaltopentose. Porém, muitos desses açúcares estão presentes em muito pequenas quantidades e não ocorrem no néctar, resultando das enzimas adicionadas pelas abelhas durante a produção do mel e reações químicas no material concentrado (White & Doner, 1980).

O teor total de açúcares redutores como a frutose e glicose para o mel de néctar com o qual iremos trabalhar, estão tabelados para o mínimo de 60g/100g de mel. Porém, para o teor de sacarose em geral estão no máximo, na ordem de 5g/100g de mel, enquanto para casos específicos como o da *Robinia pseudoacacia*, *Eucalyptus camandulensis*, *Citrus spp.*, *Medicago sativa*, *Banksia menziesii*, *Hedysarum*, *Eucryphia lucida*, *Eucryphia nilligani*, o valor tabelado é de 10g/100g de mel no máximo sendo para *Lavandula spp.* e *Borago officinalis* um máximo de 15g/100g de mel (Diretiva 2001/110/CE, 2001).

2.1.1.3.5. Acidez livre e lactónica

O poder ácido presente no mel é uma propriedade importante porque tem implicações ao nível da ecologia microbiana bem como na natureza e dinâmica da sua

alteração, pois a acidez natural de mel inibe muitos agentes patogênicos, protegendo contra a invasão deste produto por microrganismos bacterianos e evitando a sua deterioração (Malika *et al.*, 2005). O peróxido de hidrogênio e ácidos fenólicos tais como ácido felúrico e ácido caféico contribuem, também, para a inibição microbiana (Wahdan, 1998, Zandamela, 2008).

De entre os ácidos orgânicos, o ácido glucônico tem sido considerado o mais importante. Contudo, foram identificados cerca de 20 ácidos orgânicos no mel: ácido fórmico, cítrico, acético, oxálico, málico, láctico, sucínico, butírico, fórmico, fosfórico, piroglutâmico entre outros (White *et al.*, 1980).

No mel, os ácidos originam-se, basicamente, a partir da ação das secreções digestivas das glândulas salivares das abelhas, que produzem atividades enzimáticas e fermentativas (Zandamela, 2008). Mas, a acidez neste caso, resulta dos ácidos orgânicos em equilíbrio com as suas lactonas, ou ésteres, e alguns iões inorgânicos, tais como sulfatos, cloratos e fosfatos, cujos ácidos correspondentes estão presentes no mel (Perez-Arquillué *et al.*, 1994).

A acidez do mel pode ser aumentada ao se constatar uma subida de formação de hidroximetilfurfural pela desidratação das hexoses devido ao aquecimento excessivo que também se pode converter por decomposição em ácido fórmico e levulínico (Pérez, 2003). Mas também a fosfatase ácida, que é uma enzima relacionada com a origem botânica do néctar, os seus valores já foram reportados no mel e sobretudo a sua atividade durante a fermentação pode aumentar, contribuindo para a acidez do mel. (Alonso-Torre *et al.*, 2006).

No mel, pode-se determinar a acidez livre, a acidez lactónica e acidez total, sendo a relação da acidez livre e lactónica a que melhor traduz a origem botânica do mel, tanto floral como de melada (Sancho *et al.*, 1990; Pérez, 2003). Ademais, a acidez lactónica é uma reserva ácida porque liberta ácidos quando o mel sofre uma alcalinização (Pérez, 2003). Por sua vez, as lactonas estão fundamentalmente constituídas por glucolactonas e estão em estabilidade com o ácido glucônico, alguns iões inorgânicos tais como fosfatos e sulfatos (White Jr *et al.*, 1962; Terrab *et al.*, 2002).

O teor da acidez livre e lactónica sobem no decorrer do armazenamento, mas o valor das lactonas costuma subir mais do que o dos ácidos livres (Terrab *et al.*, 2002). Porém, o teor de glicose também influencia fortemente a acidez do mel, pois a enzima D-

glucose oxidase, converte este açúcar em ácido glucónico, o qual é o mais abundante dos ácidos orgânicos, pois atinge 70 a 90% no mel. Assim, a presença deste ácido e as lactonas, comandam a acidez do mel (Zandamela, 2008).

Dos vários parâmetros do mel, a acidez é um critério importante para avaliar a qualidade, sendo o valor máximo da acidez livre permitido, em geral, de 50 meqkg⁻¹, ao passo que 80 meqkg⁻¹ é o máximo permitido para o uso industrial (Diretiva 2001/110/CE, 2001).

2.1.1.3.6. Hidroximetilfurfural - HMF

O HMF é um aldeído cíclico anormal do mel, formando-se à temperatura ambiente quando se dá a desidratação da frutose, em meio ácido e fatores como depósito a altas temperaturas, aquecimento e envelhecimento natural do mel podem tornar célere este processo (Huidobro & Simal, 1985; Pérez, 2003). Adicionalmente, o tratamento térmico aplicado ao mel, degrada as vitaminas e bionutrientes e produz um aumento simultâneo no teor de HMF e redução da atividade diastásica (Tosi, *et al.*, 2002).

A presença de HMF no mel, indica a perda da frescura e por conseguinte uma redução da qualidade do mel (Pérez, 2003).

A norma internacional estabelece, para a generalidade dos méis, com exceção daqueles para uso industrial, um teor máximo de HMF de 40mgkg⁻¹ e de 80mgkg⁻¹ para méis da região tropical (Diretiva 2001/110/CE, 2001).

2.1.1.3.7. A prolina

A prolina é um aminoácido não essencial, encontrada de forma generalizada em séries de repetições múltiplas, nas proteínas dos procariotas e eucariotas (Williamson, 1997). Este aminoácido livre é o que mais predomina no mel e reflete o nível de aminoácidos totais, apesar do mel ser uma solução rica em diversos aminoácidos e a sua composição depender da origem botânica (Bogdanov, 2002).

No mel, a prolina indica a qualidade nutricional, correspondendo a boa qualidade quando apresenta valores elevados, e a má qualidade quando apresenta valores baixos. Adicionalmente, os níveis de prolina no mel podem indicar a frescura, a maturação, ou a potencial adulteração com açúcar, correspondendo, neste caso, a baixos teores de aminoácidos. Ademais, este parâmetro não consta na diretiva da união europeia relativa

ao mel mas, de modo geral, reconhece-se que mel genuíno deverá exibir teores em prolina acima de $0,18 \text{ mgg}^{-1}$ (Bogdanov *et al.*, 2002).

2.1.1.3.8. Índice diastásico

No mel, a atividade enzimática, é essencialmente medida para avaliar possíveis adulterações deste alimento (White, 1994). Apesar da enzima diástase (α -amilase) e invertase (α -glucosidase) derivarem fundamentalmente das abelhas, diferentes tipos de méis mostram diferenças significativas em atividades enzimáticas (Oddo *et al.*, 1990, White, 1994). Porém, a enzima diástase, para além de ter origem nas abelhas, está também associada ao processo de amadurecimento do néctar por elas recolhidas, a sua principal função é de digerir as moléculas de amido (White, 1994).

A diástase é muito sensível ao calor e assim pode indicar o grau de sobreaquecimento, conservação e frescura do mel (Silva, *et al.*, 2009; White, 1994). Portanto, a sua ausência reflete fraudulência realizada no mel, por exemplo a sujeição a temperaturas superiores a 60°C , condições de armazenamento que provocam a desnaturação e o conseqüente decréscimo da mesma (White, 1994; Tosi, 2008).

Por mais que méis diferentes apresentem valores da diástase bem variáveis (Oddo *et al.*, 1990; White, 1994; Bogdanov *et al.*, 2002), a legislação estabelece um mínimo de 8 unidades de Schade (DN) para a generalidade dos méis, com exceção dos méis de citrinos, cujos teores enzimáticos são naturalmente baixos, para os quais tem de ser superior a 3 DN (Diretiva 2004/110/CE, 2001; Bogdanov *et al.*, 2002).

2.1.1.3.9. Atividade antioxidante

Os agentes antioxidantes são substâncias que, ao estarem presentes num substrato orgânico, captam radicais livres e inibem a peroxidação lipídica (Cook & Semman, 1996). Este fenómeno é muito importante na saúde humana, visto que os radicais livres provocam várias doenças humanas, incluindo cancro, esclerose múltipla, doenças autoimunes e Parkinson (Halliwell & Gutteridge, 1986). Adicionalmente, estes antioxidantes podem atuar como conservantes de alimentos, retardando a sua oxidação e a conseqüente putrefação (Gomes, 2009).

Os principais compostos presentes no mel que lhe conferem as propriedades antioxidantes são as enzimas catalase, glucose-oxidase e peroxidase, e substâncias não enzimáticas como o α -tocoferol, ácido ascórbico, carotenoides, proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (Ferreira *et al.*, 2009).

Alguns dos ácidos fenólicos que já foram isolados do mel incluem o ácido gálico, o ácido clorogénico, o ácido cumárico e o ácido caféico (Yao *et al.*, 2004). Contudo, os compostos fenólicos e os flavonoides são colocados no grupo dos compostos mais ativos no que se refere à capacidade de retenção de radicais livres (Ferreira *et al.*, 2009).

Portanto, a determinação da atividade antioxidante tem sido levada a cabo por métodos como a determinação de teor em fenóis totais, a determinação da capacidade bloqueadora de radicais livres e do poder redutor (Lopes, 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo e amostragem

As amostras usadas neste estudo são oriundas da Serra do Buçaco, de áreas pertencentes ao concelho de Mealhada (4 amostras), Penacova (4), Coimbra (1) e Mortágua (1). Os locais estão assinalados na Figura 2.

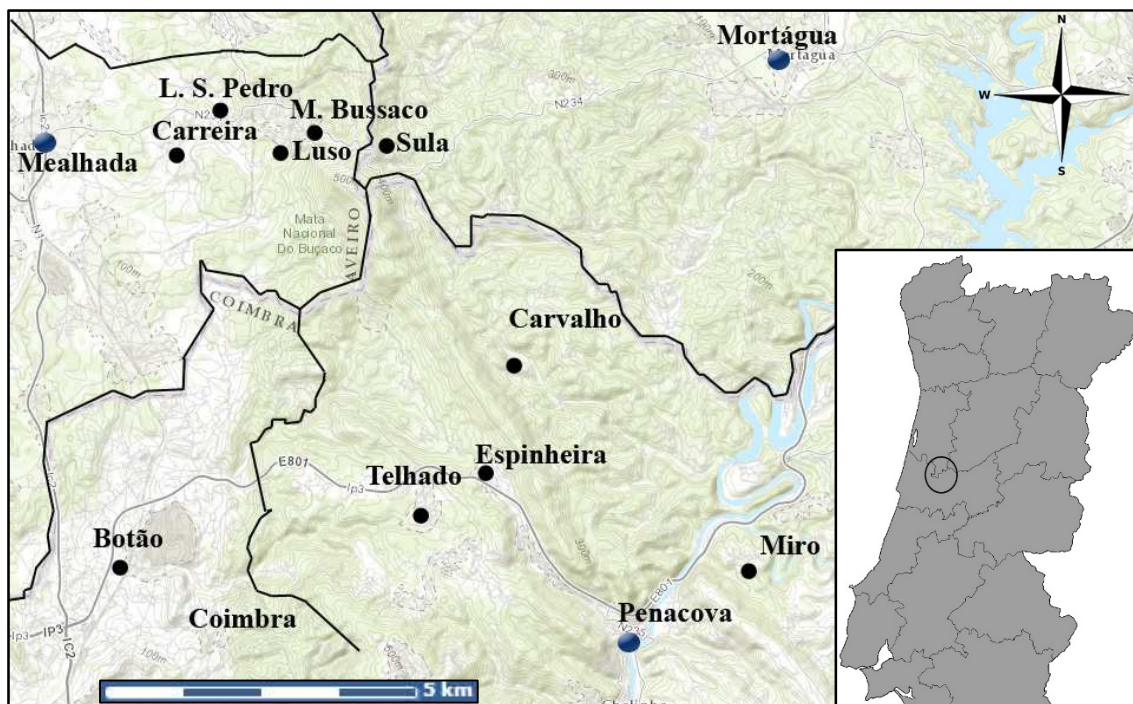


Figura 2 – Mapa da área envolvente da Serra do Buçaco, com indicação das freguesias de origem das amostras (círculos negros) e respetivos municípios (círculos azuis). Adaptado de SNIG, 2015.

Para a amostragem foram recolhidas 10 amostras de mel de apiários da região, com números de colmeias variáveis entre cerca de 6 a 418 em cada apiário, nas freguesias indicadas na Tabela II.

As amostras foram disponibilizadas pela Associação dos Apicultores do Litoral Centro, devidamente embaladas com rótulos com informação identificativa da origem botânica multiflora para todas as amostras.

Tabela II - Origem das amostras de mel estudadas. Em todas estas freguesias foi analisada uma amostra, tendo a cresta sido efetuada em julho de 2014.

Localidade	Freguesia	Concelho
Carreira	Vacariça	Mealhada
Botão	Souselas	Coimbra
Sula	Trezói	Mortágua
Telhado	Fig. de Lorvão	Penacova
Espinheira	Sazes de Lorvão	Penacova
Carvalho	Carvalho	Penacova
Miro	Penacova	Penacova
Mata do Buçaco	Luso	Mealhada
Luso	Luso	Mealhada
Lameira de S. Pedro	Luso	Mealhada

3.1.1 A Serra do Buçaco

A Serra do Buçaco é uma elevação montanhosa com uma orientação geral NW-SE (Morais, 2002), que antigamente era conhecida por Serra de Alcoba e tem 549 metros de altitude máxima, registada no marco geodésico que se encontra no seu planalto. Estende-se desde o Mondego, ao longo de aproximadamente 15 km, reunindo a vertente do topo noroeste condições naturais favoráveis ao desenvolvimento de uma densa biodiversidade vegetal (Simões, 2010).

Localizada em Portugal continental, insere-se maioritariamente no concelho de Penacova, e parte dos concelhos de Mortágua e Mealhada. Contém ainda, na sua extensão em Penacova, o conjunto de moinhos de vento da Portela da Oliveira, o santuário da Senhora do Monte Alto, a porção da Livraria do Mondego e por fim a Mata Nacional do Buçaco (Simões, 2010).

A mata, com uma exposição predominantemente norte, localiza-se no extremo noroeste da Serra do Buçaco, a 40 km da costa atlântica, administrativamente na freguesia do Luso, concelho de Mealhada, distrito de Aveiro entre os paralelos 40° 22' 15''N e 40° 23' 1''N e entre os meridianos 8° 21' 26''W e 8° 22' 30''W. A área florestada ocupa aproximadamente 105 ha, com cerca de 1450 m de comprimento e uma largura de 950 m, entre a porta de Coimbra e porta de Sula (Lopes, 2012).

3.1.1.2 Hidrografia

A totalidade das linhas de água da mata do Buçaco drenam para o rio Cértima que por sua vez aflui na margem esquerda do rio Vouga e, por conseguinte, faz parte da sua bacia hidrográfica. A Norte encontra-se o Vale de Santo Elias, e a Sul o Vale do Carregal que se unem e formam o vale dos fetos. As linhas de água apresentam escoamento no período das chuvas, e secam no verão. As margens apresentam tanto um coberto vegetal composto por espécies exóticas como por autóctones, em função do coberto vegetal dos respetivos trajetos (ANF, 2009).

3.1.1.3 Geologia

Na Serra do Buçaco estão presentes rochas desde o Proterozóico ao Quaternário, embora com predominância do Proterozoico, do Ordovícico e do Silúrico. A sequência das rochas ordovícico-silúricas está assente em discordância sobre as rochas subjacentes que são o Complexo Cristalofílico constituído por xisto, o Complexo Xisto-Grauváquico constituído por xistos, metagrauvaques, metaquartzovaques e mais raramente metaconglomerados que representam as rochas mais antigas. As rochas mais recentes compreendem: as formações do Cretácico e o “grés do Buçaco”. A região possui ainda importantes aquíferos, tais como o “aquífero termal do Luso”, o “aquífero suspenso da cruz alta”, o “aquífero de Penacova” e o “aquífero da fonte de S. João” (Sequeira & Medina, 2004).

3.1.1.4 Clima

Segundo a classificação de Thornthwaite-Mather, a Mata Nacional do Buçaco apresentou, no período de 1926 a 1942¹, um clima mesotérmico, super-húmido, com défice de água moderado no verão. A precipitação média anual é de 1525 mm, com máxima mensal de 225,2 mm em dezembro e 221,5 mm em janeiro. Os meses mais secos são agosto com 20,4 mm e julho com 25,0 mm (Santos, 1993).

A temperatura média anual tem sido de 14,0°C, com uma amplitude térmica anual de 13,8°C, resultando de um máximo de 21,4°C em agosto e um mínimo de 7,6°C em janeiro. As médias das temperaturas máximas têm variado entre 27,4°C e 10,3°C em

¹ Apesar de desatualizados, estes dados são os melhores existentes visto que são da própria Mata do Bussaco, enquanto as estações com dados mais recentes (Coimbra e Coimbra/Bencanta) encontram-se geograficamente mais afastadas da Serra do Bussaco (Santos, 1993).

agosto e janeiro, respetivamente, resultando numa média anual de 18,2°C, enquanto médias das temperaturas mínimas têm variado entre 15,5°C e 4,8°C em agosto e janeiro, respetivamente, resultando numa média anual de 9,7°C. Contudo, 40,4°C já foi registada em agosto como máxima absoluta e a mínima absoluta de -3,1°C foi registada em janeiro. A humidade relativa média anual do ar tem sido de 80,2% com máximo de 88,4% em novembro e mínimo de 71,0% em julho (Santos, 1993).

Os ventos NW são predominantes, seguidos dos de SE. A mata apresenta uma evapotranspiração média anual na ordem de 582,0 mm, os nevoeiros na ordem dos 29,9 dias por ano. Ocorrem geadas, granizos e saraivas. Foi registada uma média de 0,5 dias por ano de neve, variando entre 0,4 e 0,1 dias, respetivamente, em janeiro e fevereiro (Santos, 1993).

3.1.1.5 Ocupação de solo

A atividade agrícola ocupa 29% dos solos, com predominância de 40% de monocultura de eucalipto e aproximadamente 22% de pinheiro-bravo. Os terrenos são propriedades privadas cuja intensa repovoação por *Eucalyptus*, se destina a produção de pasta de papel (Matos, 2011).

Ao nível da agricultura, predominam dois tipos: a tradicional, caracterizada por ocupação de pequenas parcelas, destinadas ao consumo doméstico e a outra, mais intensiva, caracterizada por sistemas mecanizados, destinado ao comércio. Em ambos os casos, as culturas mais importantes são o milho (*Zea mays* L.), variedades de feijões (*Phaseolus spp.*), uva (*Vitis vinifera* L.) para a produção de vinho, oliveira (*Olea europea* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), frutas (tais como maçãs, *Malus spp.*, citrinos, *Citrus spp.*, entre outras) e uma diversidade de vegetais como repolho (*Brassica oleracea* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), etc. (Matos, 2011). Contudo, os terrenos de relevo médio e baixo a alto são, em geral, cobertos com plantações de *Eucalyptus globulus*, que foram plantadas, sobretudo, na segunda metade do século XX (Radich, 2007).

3.1.1.6 Flora e fauna

Pinho *et al.* (2009), estudaram a flora e a vegetação da mata do Buçaco e constataram uma elevada diversidade botânica, com um cumulativo de 257 espécies arbóreas e arbustivas, organizadas em 4 grandes unidades da mata: arboreto, bosque climácico da Cruz Alta, pinhal do Marquês e um grupo formado pelos jardins, Vale dos Fetos e Vale dos Abetos.

O arboreto ocupa cerca de 80% da área de floresta, apresentando diversidade de árvores e dezenas de "exemplares notáveis", que foram classificadas com base em seu tamanho, idade, raridade ou singularidade nacional. Alguns exemplos de árvores presentes no arboreto do Buçaco são *Cupressus lusitanica* Mill., *Quercus robur* L., *Q. pyrenaica* Willd., *Q. suber* L., *Laurus nobilis* L., *Phillyrea latifolia* L., *Prunus laurocerasus* L., *Abies alba* Mill., *Acer pseudoplatanus* L., *Fraxinus americana* L., *Pinus radiata* D. Don, *Cedrus atlantica* (Endl.) G. Manetti ex Carrière, *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco, *Araucaria bidwillii* Hook., *Ulmus minor* Mill., *Castanea sativa* Mill., *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. e *Eucalyptus regnans* F. Muell.

A vegetação climácica ao redor da Cruz Alta, que cobre cerca de 17,5 ha, apresenta como espécies mais frequentes *Phillyrea latifolia* L., *Arbutus unedo* L., *Laurus nobilis* L., *Ilex aquifolium* L., *Viburnum tinus* L., *Quercus robur* L. e *Q. pyrenaica* Willd.

O pinhal do Marquês ocupa cerca de 13 ha e apresenta como espécie dominante o pinheiro bravo *Pinus pinaster* Aiton.

O grupo formado pelos jardins, Vale dos Fetos e Vale dos Abetos ocupa 6,4 ha. Os jardins rodeiam o hotel com diversas espécies ornamentais, tais como *Magnolia grandiflora* L., *Ginkgo biloba* L., *Staphylea colchica* Steven e *Spiraea cantoniensis* Lour. No Vale dos Fetos podem ser encontrados fetos arbóreos da espécie *Dicksonia antarctica* Labill. e no Vale dos Abetos diversos *Abies alba* Mill.

Contudo, podem ainda ser encontradas, dispersas por algumas das áreas mencionadas, várias plantas invasoras tais como *Acacia dealbata* Link, *Acacia longifolia* (Andrews) Willd., *Acacia melanoxylon* R. Br., *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, *Pittosporum eugenioides* A. Cunn., *Robinia pseudoacacia* L. e *Tradescantia fluminensis* Velloso. Estas têm, no entanto, sido alvo de importantes medidas de controlo e erradicação no âmbito do projeto BRIGHT (FMB, 2012).

Relativamente à fauna, na mata existem 5 espécies de peixes, 10 espécies de anfíbios, 14 espécies de répteis, cerca de 65 espécies de aves e 22 espécies de mamíferos (Matos *et al.*, 2007), além de 22 espécies de moluscos e 134 de borboletas, sendo 70 diurnas e 64 noturnas (Paiva, 2004). Efetivamente, durante as visitas feitas para este estudo, foi possível observar uma elevada diversidade de insetos, incluindo a *Apis mellífera*, em uma também elevada diversidade de flores, que eram alvo do nosso estudo.

3.2 Procedimentos metodológicos

Os métodos utilizados neste trabalho estão divididos em duas áreas principais: melissopalinologia, referente à preparação e análise do espectro polínico e de elementos de melada e análises físico-químicas, metodologias diretamente ligadas à qualidade do mel.

3.2.1 Caracterização melissopalinológica

Nesta componente, começou-se por elaborar uma palinoteca de referência, para posterior comparação com os grãos de pólen observados no mel, com base na recolha de flores nas zonas próximas aos locais de amostragem.

As flores recolhidas foram selecionadas de entre as que observámos serem visitadas pelas abelhas, ou que pareceram poder sê-lo, ou das quais tivéssemos conhecimento pela literatura científica de serem visitadas pelas abelhas. Para completar ainda mais a palinoteca, recolhemos no herbário amostras de flores referenciadas na literatura como sendo usadas pelas abelhas e que, embora as tivéssemos encontrado no campo, não estivessem em floração. Depois, todas as amostras foram preparadas pelo método da acetólise (Erdtman, 1971), a fim de destruir o conteúdo intrapolínico, bem como hifas de fungos, leveduras, algas e para a limpeza da exina bem como de outras partículas microscópicas normalmente não características do mel.

Com este objetivo, sempre que possível, dissecaram-se as flores, retirando as anteras. Estas foram maceradas em cima de uma rede metálica, com poro de 125 µm, com adição de água destilada, para um tudo de centrifuga. Após agitação num agitador tipo Vórtex, procedeu-se a centrifugação durante 5 min a 3400 rpm, numa centrífuga Eppendorf 5415R (Hamburg. Germany). Após este passo, decantou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 ml de água destilada, repetindo-se o procedimento anterior. Este mesmo procedimento foi, ainda, repetido mais uma vez com 1ml de ácido acético. Procedeu-se, depois de nova decantação, à acetólise, adicionando a mistura de 1 ml de ácido sulfúrico

e 9 ml de anidrido acético e depois os tubos foram levados ao banho-maria, a 100°C, durante 4 min – 5 min, até surgir uma coloração castanha escura. Após nova decantação, adicionou-se 1,0 ml de água destilada e repetiu-se a agitação e centrifugação, acima indicada. Finalmente, após decantação, adicionou-se ao sedimento uma mistura de 5 ml de glicerol e 5 ml de água destilada. Depois de repetir a agitação no Vórtex, centrifugação e decantação, colocaram-se os tubos a secar numa estufa a 40° C, durante 2 horas. De seguida foram adicionadas, com uma pipeta Pasteur, 3 a 4 gotas de gelatina glicerinada, consoante o volume de sedimento polínico, e agitou-se vigorosamente. Deste preparado, foi pipetada uma gota para uma lâmina, coberta lentamente por uma lamela de 22 x 22 mm e selada com verniz das unhas. A identificação dos diversos tipos polínicos foi feita com base na palinoteca produzida a partir das flores, por este método da acetólise aqui descrito.

Para elaboração de amostras dos grãos de pólen contidos no mel, para análise qualitativa, dissolveu-se 10 g de mel em 20 ml de água destilada e, com um agitador magnético, homogeneizou-se o mel a 40°C. Depois, a solução foi colocada no tubo Falcon e centrifugada numa centrífuga Omnifuge 2.0 RS (Heraeus Sepatech, Osterade, Germany), durante 10 min a 3600 rpm. Seguidamente, decantou-se o líquido sobrenadante, e o sedimento foi transferido para tubos Eppendorf de 1.5 ml. Em seguida, procedeu-se como descrito acima, a partir da centrifugação na centrífuga Eppendorf, até obter as preparações dos grãos de pólen contidos em cada amostra de mel. Nestas, contou-se pelo menos 1200 grãos de pólen ao microscópio ótico em ampliação de 40x, em 6 linhas paralelas que permitiram um varrimento de toda a lâmina. As frequências relativas foram determinadas, privilegiando-se a metodologia descrita por Louveaux *et al.*, (1978).

Para a análise quantitativa pesou-se de entre 1 g a 3 g de mel, adicionou-se de entre 20 ml a 40 ml de água destilada morna (30° C), conforme as amostras, homogeneizou-se, e à mistura adicionou-se 1 gota de 0,1% de fucsina básica em etanol. Depois de montado o aparelho de filtração sob vácuo com um filtro de membrana de ésteres de celulose misturados, de referência A300A025A (Advantec, Japan), humedeceu-se com água a superfície do filtro e, seguidamente, foi despejada a solução de mel procedendo-se à filtragem. Quando a filtração terminou, o filtro foi removido com uma pinça e deixou-se a secar a 40° C numa placa de aquecimento. Depois, o filtro foi colocado numa lâmina e duas gotas de óleo de imersão foram adicionadas e cobertas por uma lamela. Finalmente, com objetiva de 40x, contou-se 500 elementos (de grãos de

pólen - GP e elementos de melada - EM) em 100 campos, em 10 linhas paralelas equidistantes e os cálculos dos resultados fez-se seguindo a fórmula:

Número absoluto de grãos de pólen: $GP/10\text{ g} = (S \times nGP \times 10) / (s \times a \times P)$; número absoluto de elementos de melada: $EM/10\text{ g} = (S \times nEM \times 10) / (s \times a \times P)$; número total de elementos: $N=GP/10g+EM/10g$. Onde: S – área da superfície da parte do filtro contendo sedimento (mm^2), s – área de um campo microscópico com a ampliação utilizada (mm^2), nGP – número total de grãos de pólen contados, nEM – número total de elementos de melada contados, a – é o número de campos contados e p – é o peso do mel, N – é o número total de elementos. Este método foi implementado segundo Ohe *et al.* (2004). Para além do processo de identificação e contagem dos grãos de pólen por MO, fez-se a micrometria do tamanho dos eixos dos grãos de pólen e da espessura da exina para os tipos polínicos mais representativos, cinco grãos de cada espécie como forma de garantir a fiabilidade dos resultados. Aplicou-se o fator de correção de 0,85, visto que os grãos medidos foram preparados em gelatina glicerinada que, com o passar de tempo sofrem uma dilatação.

Finalmente, a fim de certificar os tipos polínicos mais frequentes nas amostras de mel, foi utilizada a Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV) para estudar a ornamentação da exina e os tipos, número e posição das aberturas dos grãos de pólen (Sajwani *et al.*, 2007). Em primeiro lugar, os grãos de pólen trazidos do processo de acetólise foram desidratados em ácido acético e, posteriormente, colocados em bases metálicas e revestidos com uma película de ouro / paládio em alta pressão no vácuo, numa câmara de pulverização catódica Jeol JFC - 1100 (JEOL, Ltd., Tokio, Japan). Em seguida, os grãos de pólen foram observados num Hitachi SU 70 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan), operando a 10 kV. No final, as fotografias selecionadas foram analisados com Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems, Mountain View, California, USA)

3.2.2 Caracterização físico-química

Nesta componente importa referir que, dos parâmetros analisados, foram feitas três réplicas cada, de modo a verificar o grau de dispersão dos valores do desvio padrão relativamente ao valor da média e, assim, garantir-se a confiança nas análises.

3.2.2.1 Humidade

A humidade foi um dos parâmetros cujo resultado foi expresso em percentagem., Este foi determinado com o auxílio de um refratómetro DIGIT – 5890 (PCE instruments,

Bacanja, Espanha), por uma prévia adição de gota de mel ao prisma do aparelho, seguida de observação e registo do resultado.

3.2.2.2 Cor

A colorimetria das amostras foi feita mediante um aquecimento prévio do mel a 45°C, para dissolver os cristais de açúcar, e de seguida mediu-se a cor com auxílio de um colorímetro Hanna Instruments C221 (Woonsocket, RI, USA). A escala usada para a classificação dos méis foi a Pfund, através da leitura direta, pelo próprio instrumento de medida (Bogdanov *et al.*, 2002).

3.2.2.3 Condutividade elétrica

Para a leitura da condutividade pesou-se 20 g de mel, dissolveu-se em 100 ml de água destilada e a solução obtida foi submetida a um medidor de condutividade Consort C868 (Turnhout, Belgium), calibrado com antecedência. Os resultados foram expressos em mScm^{-1} (Bogdanov *et al.*, 2002; IHC, 2009).

3.2.2.4 Acidez e pH

Na análise das propriedades ácidas, fez-se a avaliação do pH, da acidez livre e da acidez lactónica. Primeiramente fez-se a determinação do pH da solução inicial do mel diluído e depois fez-se a titulação para a determinação, tanto da acidez livre como da lactónica. Porém, na determinação da acidez livre fez-se uma titulação no momento de equivalência do valor $\text{pH} = 7$, e também outra titulação a pH estável de 8,3 (Bogdanov *et al.*, 2002; IHC, 2009).

No começo, preparou-se a solução inicial através da dissolução de 10 g de mel em 100 ml de água desionizada. Depois, pipetou-se 25 ml da solução obtida para um copo e aumentou-se o volume com água desionizada até 150 ml de forma que o eléctrodo de pH ficasse parcialmente submerso, registando-se o valor inicial. De seguida, procedeu-se à titulação da solução do mel com o hidróxido de sódio – NaOH a $0,1 \text{ moldm}^{-3}$, e assim o volume da base gasta para atingir o momento de equivalência ($\text{pH} = 7$) foi determinado e mais adiante também determinado o volume para atingir o ponto fixo ($\text{pH} = 8,3$) e a partir desses valores foi possível determinar a acidez livre. A acidez lactónica foi determinada quando se completou a adição de base até atingir o volume final de 10 ml, fazendo-se de seguida uma retrotitulação da base em excesso com ácido sulfúrico (H_2SO_4) a $0,025 \text{ moldm}^{-3}$ até atingir de novo o ponto de equivalência ($\text{pH}=7$) e pela diferença de NaOH gasto nas duas titulações foi determinada a acidez lactónica que, por sua vez, permitiu

determinar a acidez total pelo somatório da acidez (livre + lactónica). A titulação para a medição destes parâmetros foi efetuada por um aparelho automático de titulação Hanna instruments HI 902C (Woonsoket, Rhode Island, USA).

3.2.2.5 Hidroximetilfurfural – HMF

O teor em HMF foi analisado mediante espectrofotometria, para avaliar as condições de conservação, seguindo-se a metodologia descrita por Bogdanov *et al.* (2002).

Para o efeito, dissolveram-se 5 g de mel em 25 ml de água desionizada e, de seguida, transferiu-se esta solução para um balão volumétrico de 50 ml. Neste, adicionou-se 0,5 ml de solução Carrez I, mais 0,5 ml de solução de Carrez II, e o volume total foi acertado com água desionizada. Seguidamente, filtrou-se a solução para um copo, desprezando os primeiros 10 ml da solução filtrada, e foram recolhidas duas frações de 5 ml para dois tubos de ensaio, uma que era a “amostra” e outra o “branco”. No tubo da amostra foram adicionados 5 ml de água desionizada e no tubo do branco 5 ml de solução de bissulfato de sódio (NaHSO₃) a 0,2%. De seguida, ambas foram levadas ao espectrofotómetro Specord 200 (Analytikjena, Jena, Germany) onde foram lidas as absorvâncias a 284 nm e 336 nm. Finalmente, o valor de HMF foi calculado usando a equação (1):

(Equação 1) $HMF = (Abs\ 284 - Abs\ 336) \times 149,7 \times (5/massa\ da\ amostra)$ e os resultados foram expressos em mgKg⁻¹.

3.2.2.6 Índice diastásico

O método usado para determinar o índice diastático foi o de Phadebas, seguindo-se o procedimento metodológico indicado por Bogdanov *et al.* (2002) e IHC (2009).

Fez-se a diluição de 1 g de mel num balão volumétrico de 100 ml, onde 5 ml da solução obtida foram transferidos para um tubo de ensaio. Em paralelo, foi preparada uma solução “Branco” pela introdução em outro tubo de ensaio de uma solução tampão de acetato 0,1 moldm⁻³ (pH 5,2). De seguida, ambas soluções foram levadas ao banho-maria a 40° C. Depois de retiradas do banho, aos dois tubos de ensaio foram adicionados pastilhas Phadebas e agitados num vórtex. De seguida, mantiveram-se ambos os tubos num banho a 40°C, durante 15 minutos, para permitir a reação, e depois centrifugaram-se durante 5 minutos a 3700 rpm numa centrífuga K24OR-2003 (Centurion Scientific,

Arundel, UK). Finalmente, pipetou-se a solução sobrenadante, leu-se a respectiva absorvância a 620 nm num espectrofotómetro Specord 200 (Analytikjena, Jena, Germany) e os resultados, apresentados como índice diastático - (DN), foram expressos em unidades Schade, correspondendo uma unidade de diástase à atividade enzimática de 1 g de mel capaz de hidrolisar numa hora 0,01 g de amido a 40° C.

3.2.2.7 Prolina

Para além do HMF, a prolina pode também indicar o estado de conservação do mel, principalmente a frescura ou adulteração (Lopes, 2014).

Para a sua avaliação, fez-se a diluição de 5 g de mel em 100 ml de água desionizada num balão volumétrico. Depois, retirou-se para o primeiro tubo de ensaio 0,5 ml da solução que representa a “amostra” e ao segundo tubo de ensaio, adicionou-se 0,5 ml de água desionizada que representa o “branco”. Num terceiro tubo de ensaio, colocou-se 0,5 ml de solução “padrão” de prolina a 0,032 mgml⁻¹, e triplicou-se. Em seguida, adicionou-se a cada um dos 3 tubos de ensaio, 1 ml de ácido fórmico a 98% e ainda mais 1 ml de solução de ninhidrina a 3% e agitou-se vigorosamente por 15 minutos. Depois, os tubos foram levados ao banho-maria a 100° C, durante 15 minutos e seguidamente a outro banho durante 10 minutos a 70° C. Para finalizar, adicionou-se aos tubos 5 ml de 2 – propanol a 50%, e deixaram-se arrefecer fechados, em repouso, durante 45 minutos. Em seguida, através de um espectrofotómetro Specord 200 (Analytikjena, Jena, Germany), leu-se a absorvância a 510 nm, e a absorvância do padrão foi calculada através da média dos três ensaios.

Os resultados da prolina, foram calculados mediante a equação (2):

(Equação 2) Prolina = (Abs amostra/Abs padrão) x (massa padrão/massa amostra) x 80.

3.2.2.8 Perfil em açúcares

A cromatografia líquida foi o método usado para determinar o perfil em açúcares, segundo a metodologia de Gardana com algumas modificações (Gardana *et al*, 2007).

O sistema de cromatografia foi acoplado a um detetor de índice de refração (HPLC-RI) e utilizou-se uma reta de calibração com padrões externos. O sistema de cromatografia foi composto por uma bomba, sistema Smartline 1000, um degaseificador, sistema Smartline 5000, um detetor de RI Smartline 2300 (todos Knauer, Berlin, Germany) e um amostrador automático AS-2057 (Jasco international corporation Co.,

Ltd, Hachioji, Tokyo, Japan). Para o ensaio, diluiu-se 2,5 g de mel em 20 ml de água destilada, de seguida pipetou-se 11,5 ml de metanol e transfetiu-se a solução de mel para um balão volumétrico de 50 ml. O volume total foi alcançado com a adição de água destilada. Em seguida, fez-se a filtração da solução com auxílio de um filtro de *nylon* de 0,2 μm e as amostras foram injetadas no sistema cromatográfico. Na separação cromatográfica, foi utilizada uma coluna 100-5 NH2 Eurospher (4,6x250 mm, 5mm) (Knauer, Berlin, Germany) atuando a 30°C, num forno Grace 7971 R (Macclesfield, UK). A fase móvel utilizada foi a mistura de acetonitrilo/água na proporção de 80:20 (v/v), com um caudal de 1,3 mlmin⁻¹.

Os açúcares foram identificados mediante a comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões tais como: frutose, glucose, sacarose, turanose, maltulose, maltose, trealose. Estabeleceram-se retas de calibração pelo método de padrão externo para cada um dos padrões mencionados. Para tal, utilizou-se uma série de concentrações em conformidade com os níveis esperados para cada açúcar (v. Tabela III), pelo referido método.

Os dados foram analisados com o *software* Clarity 2.4 (Data Apex, Prague, The Czech Republic). Os valores para as amostras foram calculados a partir da área dos picos e foram apresentados em g/100g de mel.

Tabela III – Intervalo de concentrações dos padrões de açúcares, suas retas e coeficientes de correlação.

Açúcares padrão	Intervalo de concentrações (mgml⁻¹)	Reta de calibração	R²
Frutose	3,8 – 60,0	$y = 46,379x + 5,5802$	0,9991
Glucose	2,8 – 45,0	$y = 45,856x - 54,145$	0,9993
Sacarose	0,9 – 12,6	$y = 68,455x - 22,46$	0,9975
Turanose	0,6 – 7,7	$y = 58,107x - 4,6676$	0,9999
Maltulose	0,2 – 2,2	$y = 31,145x + 1,8492$	1,0000
Maltose	0,6 – 7,7	$y = 20,89x + 9,1014$	0,9884
Trealose	0,3 – 4,4	$y = 116,87 + 1,5391$	0,9987

3.2.2.9 Atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante foram usados três parâmetros: teor em fenóis totais, o efeito que as 10 amostras de mel tiveram em bloquear os radicais livres do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e o teste do seu poder redutor.

3.2.2.9.1 Teor em fenóis totais

Seguiu-se o método de Folin-Ciocalteu para a determinação do conteúdo fenólico total, com algumas modificações. Este é um método colorimétrico altamente sensível, preciso, reprodutível e de resposta rápida (Alves *et al.*, 2013).

A sonda de antioxidante nesta reação é reduzida pelos antioxidantes do mel e provoca a formação de um complexo de cor azul, formado com o reagente ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (Reagente de Folin-Ciocalteu). Este complexo apresenta uma absorvância máxima a 745-765 nm e os resultados devem ser interpretados como uma estimativa do teor de fenóis, já que se conhece a capacidade dos açúcares redutores intervir na reação de Folin. Todavia, considerando que os açúcares irão contribuir de igual forma para as diferentes amostras de mel, então pode traduzir-se as diferenças dos resultados como o reflexo em conteúdo de compostos fenólicos (Lopes, 2014).

Primeiramente, pesou-se 1 g de mel e dissolveu-se em 10 ml de metanol (CH₃OH). Seguidamente, foi adicionada a uma fração de 0,5 ml desta solução, 0,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu e, passados 3 minutos, adicionou-se 1ml de solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (10% w/v) com água destilada, ajustando o volume final para 5 ml (Estevinho *et al.*, 2012). A solução de Na₂CO₃ foi adicionada para condicionar um meio alcalino, no qual os fenóis reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu (Magalhães *et al.*, 2008). A solução final foi levada ao escuro, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Paralelamente ao procedimento anterior, preparou-se a solução do branco, medindo-se 0,5 ml de metanol (CH₃OH) ao invés da solução da amostra do mel.

O antioxidante ácido gálico (GA) foi utilizado como padrão, numa gama de concentrações entre 0,005 – 0,15 mgml⁻¹ e obteve-se a seguinte reta de calibração: $y = 9,2388x - 0,1299$; $R^2 = 0,9988$. Posteriormente, leu-se a absorvância a 765 nm, num espectrofotómetro Specord 200 (Analytikjena, Jena, Germany).

O produto final de conteúdo fenólico foi expresso em mgGAEg^{-1} de mel, onde GAE significa unidades equivalentes em ácido gálico.

3.2.2.9.2. Efeito bloqueador de radicais livres

De forma regular, tem sido aplicado o ensaio do efeito bloqueador de radicais livres mediante o uso de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), que avalia a capacidade dos agentes antioxidantes em sequestrar radicais livres. O DPPH é um radical livre e estável, que consegue aceitar um eletrão ou um átomo de hidrogénio, tornando-se num radical facilmente oxidável, como mostra a figura 3, relativo à redução do DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

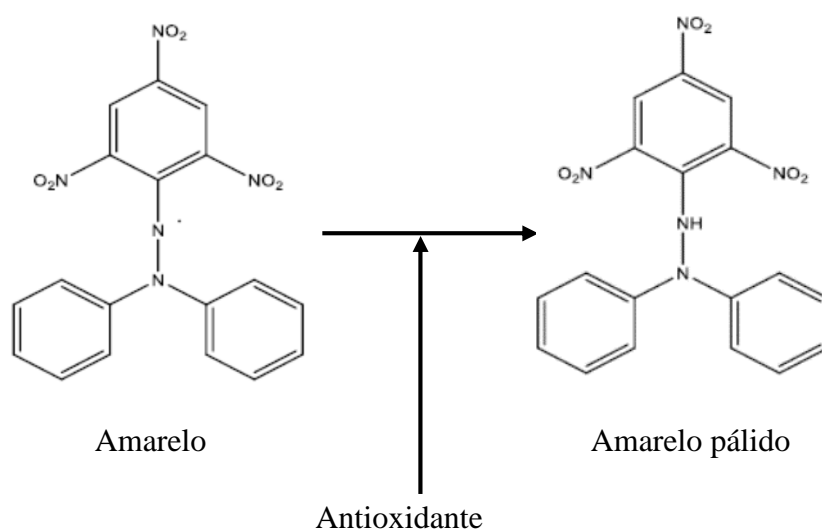


Figura 3 – Redução do DPPH na presença de um átomo de hidrogénio.

Este eletrão desemparelhado faz o DPPH possuir uma forte absorvância a 515 nm. Essa absorvância diminui durante a reação entre as moléculas antioxidantes e os radicais livres de DPPH, se o eletrão emparelhar. Com isto, quanto mais decresce a absorvância, mais elevada será a atividade antioxidante das amostras em estudo (Malheiro *et al.*, 2009).

Neste método, avaliou-se a capacidade das 10 amostras de mel bloquearem radicais livres de DPPH, seguindo-se a metodologia de (Ferreira *et al.*, 2009).

O ensaio foi feito usando-se uma placa de 96 poços. Nestes, misturou-se 10 μL de uma solução metanólica da amostra, com diferentes séries de concentrações 0,003 a 0,03 mg/ml^{-1} com 0,15 ml de outra solução metanólica que continha os radicais de DPPH ($0,060 \text{ mmoldm}^{-3}$) que foram deixadas em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 1 hora. De seguida, foi medida a redução da concentração do radical de DPPH através da monitorização da redução da absorvância a 515 nm, num leitor de microplacas

ELX800 Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, USA). Para o cálculo do efeito bloqueador de radicais de DPPH, determinou-se a percentagem da deslocação do DPPH, aplicando a seguinte equação:

$$\text{(Equação 3) - \% Efeito bloqueador} = [(ADPPH-AA)/ADPPH] \times 100$$

Onde: AA – representa a absorvância da solução com uma alíquota da amostra; ADPPH – absorvância inicial da solução de DPPH.

Os resultados deste ensaio foram expressos por meio de valores EC₅₀, equivalendo à concentração da alíquota que bloqueia 50% dos radicais de DPPH encontradas na solução inicial (Ferreira *et al.*, 2009; Falcão *et al.*, 2010). Utilizou-se a solução padrão de ácido gálico para a comparação e, seu valor médio de EC₅₀ foi de 1,22 mgml⁻¹.

3.2.2.9.3 Poder redutor

De acordo com Berker *et al.*, (2007), geralmente, os extratos naturais apresentam agentes redutores que podem ser aplicados como uma metodologia para caracterizar o poder antioxidante de uma amostra. Este fenómeno ocorre pela redução do complexo Fe³⁺, ferrocianeto, à sua forma Fe²⁺, ferrosa, causando uma coloração azul da Prússia, analisada a 700 nm.

Os resultados da cor para tons de verde e azul a partir da coloração amarela da solução ensaiada, indicam a formação de iões de Fe²⁺ mas, em função da concentração do complexo formado do poder redutor de cada extrato.

Os fenómenos químicos de redução podem ser resumidamente apresentados a seguir, pelas equações da figura 4:

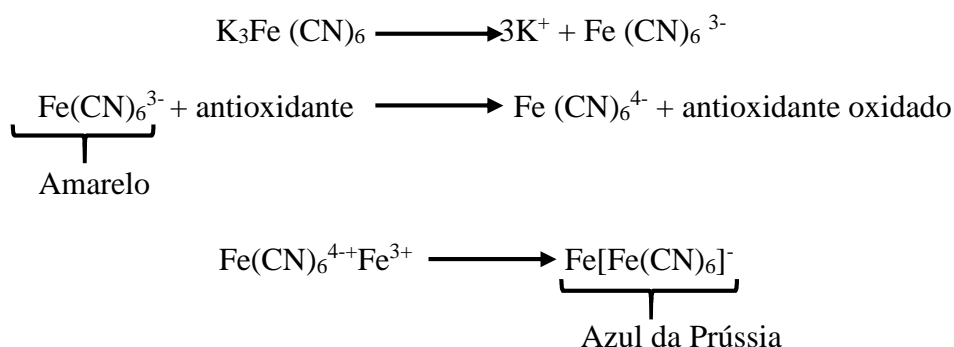


Figura 4 – Equação de redução do complexo Fe³⁺/ferrocianeto à sua forma ferrosa (Berker *et al.*, 2007).

Para a avaliação deste parâmetro, em 15 µL de solução de mel a uma concentração de 0,005 gml⁻¹ foi adicionada, de início, 1,25 ml de uma solução tampão de fosfato de

sódio com pH 6,6 e, depois, mais 1,25 ml da solução de ferrocianeto de potássio a uma concentração de $0,2 \text{ moldm}^{-1}$. De seguida, a mistura foi intensamente agitada e incubada a 50°C , durante 20 min. Depois, adicionou-se 1,25 ml de ácido tricloroacético (a 10%) e a solução foi centrifugada durante 8 minutos a 1000 rpm numa centrífuga K24OR-2003 (Centurion Scientific, Arundel, UK). Finalmente, adicionou-se aos 1,25 ml do sobrenadante retirado, 1,25 ml de água destilada e 0,25 ml de cloreto férrico a 0,1% e, de seguida, foi medida a absorvância a 700 nm num espectrofotómetro Specord 200 (Analytikjena, Jena, Germany), tendo-se como solução padrão o ácido gálico num intervalo de concentrações de 0,001 a 0,01 mgml^{-1} ($y = 34,364x - 0,0013$; $R^2 = 0,9964$). Os resultados do poder redutor foram expressos em mgGAEg^{-1} de mel, onde GAE significa unidades equivalentes em ácido gálico (Ferreira *et al.*, 2009).

3.2.3. Análises estatísticas

Os dados físico-químicos brutos das amostras, foram obtidos em triplicado e destes foram calculadas médias e desvios padrão. Pelo contrário, os dados melissopalínológicos foram expressos em percentagem das frequências do espectro polínico de plantas nectaríferas-poliníferas.

Para as análises estatísticas, usou-se o pacote estatístico SPSS v. 20.0 (IBM Corporation, NY, USA). Inicialmente, fez-se a normalização dos dados a partir da prova de normalização de Kolmogorov-Smirnov (K-S) e Shapiro-Wilk (v. Anexo I), com o objetivo de verificar se havia distribuição normal dos dados dos parâmetros físico-químicos na população, assumindo-se um nível de significância de 5%, ou seja, $p > 0,05$. Em função da normalidade verificada, procedeu-se o teste de homogeneidade de variâncias para $p > 0,05$ com objetivo de verificar a existência de variância das duas populações de méis. Aplicou-se, em seguida, o teste *t-student* para amostras independentes, separadamente para cada parâmetro físico-químico e Mann-Whitney para os dados com distribuição anormal, a fim de investigar a existência de diferenças médias dos parâmetros físico-químicos em relação aos tipos de méis e pelo método multivariado, construiu-se um dendrograma por análise de agrupamento, aplicada para estabelecer a dissimilaridade entre as amostras de mel e usou-se o coeficiente de distância euclidiana para determinar as relações de similaridade entre as amostras. Mais adiante, usou-se o programa Statistics XL para fazer a análise de componentes principais (ACP) que foi utilizado para detetar grupos de méis e para estimar a contribuição de cada parâmetro

físico-químico e espécies vegetais para a análise. Em seguida, os dados foram padronizados e a correlação entre as variáveis de matrizes foi obtida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise melissopalínológica

Foram feitas duas análises do mel, uma para a descrição quantitativa, (v.Tabela IV) e outra para a descrição qualitativa, (v.Tabela V), para assim permitir a inferência das origens botânicas. Na análise quantitativa, um mel é considerado como sendo de néctar quando a razão entre os elementos de melada e grãos de pólen de plantas nectaríferas for inferior a 1 ($EM/GP < 1$), mistura de néctar e melada quando for entre 1 e 3 e mel de melada quando for superior a 3 ($EM/GP > 3$) (Louveaux *et al.*, 1978; Ohe *et al.*, 2004).

Tabela IV – Dados da análise polínica quantitativa de amostras de méis da Serra do Buçaco.

Amostra	Peso (g)	S (mm ²)	ngp	nEM	S (mm ²)	a	GP/10g	EM/10g	n _{te}	N	nEM/nGP
Carreira	3,1	379,9	1137	1258	0,2	69	106057,9	967,3	107 x 10 ³	III	1,1
Botão	3,1	379,9	465	811	0,2	102	29238,9	421,9	30 x 10 ³	II	1,7
Sula	3,1	379,9	837	1070	0,2	69	78550,8	822,8	79 x 10 ³	II	1,3
Telhado	3,1	379,9	567	931	0,2	69	53246,0	715,9	54 x 10 ³	II	1,6
Espinheira	3,1	379,9	633	1062	0,2	69	59463,1	816,6	60 x 10 ³	II	1,7
Carvalho	1,6	379,9	746	364	0,2	69	139260,7	279,9	140 x 10 ³	III	0,5
Miro	3,1	379,9	1370	490	0,2	69	127791,8	376,8	128 x 10 ³	III	0,4
Mata do Buçaco	3,2	379,9	727	518	0,2	90	51611,4	305,4	52 x 10 ³	II	0,7
Luso	3,0	379,9	1466	198	0,2	46	214073,7	228,4	214 x 10 ³	III	0,1
L. de S. Pedro	2,3	379,9	1145	287	0,2	69	145439,3	220,7	146x10 ³	III	0,3

S - área da superfície da parte do filtro contendo sedimento, **ngp** - número total de grãos de pólen, **nEM** - número total de elementos de melada, **S** - área de um campo microscópico com a ampliação utilizada, **a** - número de campos contados, **GP/10g** - número absoluto de grãos de pólen, **EM/10g** - número absoluto de elementos de melada, **n_{te}** - número total de elementos, **N** - classes de méis de acordo com o número total de elementos da planta, **nEM/nGP** - razão entre o número total de elementos de melada e de grãos de pólen.

A tabela IV reúne os resultados encontrados para as 10 amostras de méis. A razão entre EM/GP encontra-se entre 0,1 e 1,7, permitindo inferir que 5 amostras, com EM/GP entre 0,1 e 0,7, neste caso, as de Carvalho, Miro, Mata do Buçaco, Luso e Lameira de São Pedro são classificadas como méis de néctar ou de flores enquanto as amostras de méis de Carreira, Botão, Sula, Telhado, e Espinheira, com EM/GP entre 1,1 e 1,7, são constituídas por mistura de néctar e melada. Em relação aos resultados do espectro

polínico-nectarífero encontram-se os dados na tabela V e é possível verificar uma alta representatividade de pólen de plantas nectaríferas.

De acordo com o número total de elementos, os méis são classificados em cinco classes (Ohe *et al.*, 2004). Nesta análise foi possível encontrar méis pertencentes a duas dessas 5 classes (v. Tabela IV): à classe II, que inclui a maioria dos méis multiflorais, méis de melada e mistura de méis de flores e melada; e a classe III, que inclui os méis monoflorais com pólenes sobre-representados e méis de melada. Portanto, é importante referir que esses resultados, no geral, reforçam o consenso de que as amostras são de méis florais, com excessão das últimas cinco que resultam de mistura de néctar e melada.

Em termos qualitativos, foi possível, a partir da análise microscópica do espectro polínico, identificar 99 tipos polínicos, dentre os quais 21 são de plantas nectaríferas e 3 de plantas poliníferas, ambas com representação acima de 1% (v. Tabela V). Os restantes 42 tipos polínicos não identificados e juntamente com mais 33 tipos identificados, ambos com representação minoritária $p < 1\%$, foram considerados cumulativamente como outros tipos (Tabela V).

O género *Eucalyptus* é do ponto de vista ecológico importante fonte de recursos para a formação de mel na Serra do Buçaco, pois, na zona do Luso, próximo à mesma serra, um estudo feito com 38 amostras de méis, observou que, 75% das mesmas tiveram presença de pólenes de *Eucalyptus*, e cerca de 55% das amostras foram monoflorais da mesma espécie (Silva *et al.*, 2009).

Neste estudo, o pólen de *Eucalyptus* está presente em todas as amostras de mel o que se explica pelo facto de atualmente se verificar, em grande parte das zonas amostradas, uma extensa plantação de eucaliptos. Adicionalmente, porque as espécies do género *Eucalyptus*, normalmente, apresentam uma carga polínica elevada e, por isso, são consideradas espécies sobre-representadas (Ohe *et al.*, 2004).

Em geral, o mel é considerado de origem botânica monofloral se a frequência relativa de pólenes deste *taxon* for superior a 45% e, em particular, monofloral de género *Eucalyptus* quando a frequência deste for superior a 83%, caso contrário, estaremos perante méis multiflorais (Louveaux *et al.*, 1978; Ohe *et al.*, 2004). Algumas espécies são exceção e merecem um tratamento específico, tal como foi abordado no subtítulo 2.4 da revisão da literatura deste trabalho. Portanto, os resultados encontrados para os méis de Botão, Sula e Mata do Buçaco, relativos ao espectro polínico de plantas nectaríferas, que

estão acima dos 83% (v.Tabela V), permitem, com alguma certeza, classificar estes três méis como monoflorais de *Eucalyptus*.

Tabela V – Espectro polínico de 10 amostras de méis da Serra do Buçaco.

Famílias botânicas	Tipos polínicos (Espécies)	Carreira (Ca)	Botão (Bo)	Sula (Su)	Telhado (Te)	Espinheira (Es)	Carvalho (Cv)	Miro (Mi)	M. de Buçaco (MB)	Luso (Lu)	L. de S. Pedro (LP)
Mirtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	50,9%	84,1%	87,8%	46,5%	73,5%	52,1%	70,7%	87,6%	41,4%	27,9%
Crassulaceae	<i>Sedum</i> spp.	-	-	-	-	-	-	2,6%	1,8%	-	-
Boraginaceae	<i>Echium</i> spp.	-	-	-	-	-	1,1%	-	-	-	12,9%
Ericaceae	<i>Erica</i> spp.	4,9%	2,1%	-	-	1,5%	15,9%	1,5%	-	4,2%	5,1%
Rhamnaceae	<i>Rhamnus alaternus</i> L.	8,3%	10,2%	-	23,7%	3,9%	12,1%	-	-	-	-
	<i>Genista</i> spp.	-	-	-	1,8%	-	-	1,2%	-	-	-
	<i>Acacia melanoxylon</i> R. Br.	-	-	-	2,4%	-	1,1%	-	-	-	-
Fabaceae	<i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk.	-	-	-	1,8%	-	-	2,2%	1,5%	-	-
	<i>Trifolium repens</i> L.	4,2%	-	-	-	1,0%	-	-	-	-	-
	<i>Tipo Cytisus</i>	-	-	-	5,9%	1,9%	1,7%	6,5%	-	1,1%	1,1%
Sapindaceae	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	1,5%	-	-	-	-	-	-	-	1,8%	1,1%
	Tipo A19	-	-	-	2,3%	-	-	-	-	-	-
	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott.	4,7%	-	1,2%	-	-	-	-	-	4,4%	9,9%
Rosaceae	<i>Malus</i> spp.	-	-	-	2,3%	-	-	-	-	-	-
	<i>Prunus</i> spp.	5,7%	1,2%	-	-	1,4%	2,2%	-	-	1,1%	-
	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	1,9%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Araliaceae	<i>Hedera</i> spp.	-	-	-	1,5%	-	1,5%	-	-	-	-
Apiaceae	<i>Oenanthe crocata</i> L.	2,2%	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4%
Brassicaceae	Tipo <i>Raphanus raphanistrum</i> L.	3,7%	1,4%	-	4,4%	1,3%	4,0%	8,2%	4,6%	3,3%	2,5%
Lythraceae	<i>Lythrum</i> spp.	1,8%	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4%
Salicaceae	<i>Salix</i> spp.*	0,0%	0,0%	-	-	-	0,0%	0,0%	-	-	0,0%
Cistaceae	<i>Cistus</i> spp.*	0,0%	0,0%	-	-	-	0,0%	-	-	-	0,0%
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i> Miller.	-	-	5,3%	1,2%	5,8%	-	1,5%	-	35,8%	26,8%
	<i>Quercus robur</i> L.*	-	-	0,0%	0,0%	0,0%	-	0,0%	-	-	-
	Outros Tipos***	10,2%	0,9%	5,7%	6,2%	9,7%	8,3%	5,5%	4,6%	6,9%	7,0%
	Universo polínico	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100%	100%

*Plantas poliníferas com frequências excluídas; *** Tipos polínicos cumulativos com percentagem relativa inferior a 1%, cuja relação taxonómica genérica e familiar aparecem na tabela VI.

Em relação às sete amostras restantes, por não alcançarem o valor mínimo de 83%, possuírem pólenes de *Eucalyptus* em frequências superiores às restantes espécies e não fazerem delas parte algumas das espécies sobre representadas com uma percentagem mínima para se considerarem monoflorais, foram classificadas como méis multiflorais (v. tabela V). Especificamente, a amostra de Carreira é multifloral de *Eucalyptus* spp., *Rhamnus alaternus*, *Prunus* spp. e *Rubus ulmifolius*; Telhado (*Eucalyptus* spp. e *Rhamnus alaternus*), Espinheira e Luso (*Eucalyptus* spp. e *Castanea sativa*), Carvalho (*Eucalyptus* spp., *Erica* spp. e *Rhamnus alaternus*), Miro (*Eucalyptus* spp. *R. alaternus* e *Tipo Cytisus*), L. de S. Pedro (*Eucalyptus* spp. *Castanea sativa*, *Echium* spp. e *Rubus ulmifolius*), de acordo com as teorias de Louveaux *et al.*, (1978); Ohe *et al.*, (2004).

Contudo, durante as nossas saídas de campo, observamos uma presença significativa da *Apis mellifera* em plantas exóticas melíferas tais como a *Pittosporum undulatum*, *Wisteria sinensis* e *Cercis siliquastrum*, sobretudo na mata do Buçaco. Era nossa expectativa encontrar uma representatividade de grãos de pólen de, pelo menos, algumas destas espécies, na amostra de mel da mata do Buçaco. Tal não se verificou, e não encontramos explicação para este facto, uma vez que a distância entre estas plantas e as colmeias da Mata é bem menor do que o limite de distância habitualmente percorrida pelas abelhas que, segundo Hagler *et al.*, (2011), podem aguentar até aproximadamente 6 km de percurso. Contudo, as colmeias da mata do Buçaco, estão localizadas a, aproximadamente, 2 km.

A tabela VI agrupa de forma geral os géneros encontrados nas amostras de mel, com percentagem inferior a 1%.

Estão identificados cerca de 27 géneros diferentes que são visitados por *Apis mellifera* L. para a produção de mel. Outros grupos taxonómicos, cujo pólen foi de difícil identificação, foram omitidos (v. Tabela VI).

Tabela VI - Diversidade palinotaxonómica geral < 1% das 10 amostras de méis da Serra do Buçaco.

Famílias	Géneros	Outras famílias	Género
Asteraceae	5 (<i>Crepis</i> , <i>Carduus</i> , <i>Helianthus</i> , <i>Taraxacum</i> e <i>Chrysantemum</i>)	Tiliaceae	1 (<i>Tilia</i>)
Lamiaceae	2 (<i>Lavandula</i> e <i>Rosmarinus</i>)	Brassicaceae	1 (<i>Diplotaxis</i>)
Betulaceae	2 (<i>Alnus</i> e <i>Betula</i>)	Caryophyllaceae	1 (<i>Silene</i>)
Ericaceae	2 (<i>Calluna</i> e <i>Arbutus</i>)	Xanthorroaceae	1 (<i>Asphodelus</i>)
Fabaceae	2 (<i>Vicia</i> e <i>Lotus</i>)	Vitaceae	1 (<i>Vitis</i>)
Apiaceae	1 (<i>Foeniculum</i>)	Oleaceae	1 (<i>Olea</i>)
Resedaceae	1 (<i>Reseda</i>)	Cistaceae	1 (<i>Halimium</i>)
Euphorbiaceae	1 (<i>Euphorbia</i>)	Plantaginaceae	1 (<i>Plantago</i>)
Thymelaeaceae	1 (<i>Thymelaea</i>)	Aquifoliaceae	1 (<i>Ilex</i>)
Scrophulariaceae	1 (<i>Scrophularia</i>)	Primulaceae	1 (<i>Lysimachia</i>)
Não identificados	Foram cerca de 42 espécies de um universo de 99 tipos		

4.1.2 Morfologia e diversidade polínica das espécies mais representativas

Para este trabalho, a microscopia ótica (MO) e a eletrónica de varrimento (MEV) foram essenciais.

O pólen de espécies vegetais forrageadas por abelhas melíferas pode ser identificado por meio de MEV e assim permitir a interpretação da potencial flora melífera local para expandir e sustentar a apicultura (Paudyal & Gautam, 2012), bem como para certificar a exata origem botânica.

A morfologia polínica foi usada para discriminar os tipos polínico e para tal, foi analisada a forma, o número (*mono* -, *di*-, *tri*, *penta* e *hexa*-), a posição (*Zono* ou *Panto*) e o tipo de abertura (*Poros* e *colpos*), bem como a ornamentação a superfície da exina (Carretero, 1989, Paudyal & Gautam, 2012). As dimensões indicadas resultam de medições feitas pelo autor. Listam-se, em seguida, os principais elementos morfológicos descritivos:

Família: Mirtaceae

Espécie: *Eucalyptus globulus*

Forma: Oblado, triangular na vista polar.

Tamanho: **P** – 15 (15 – 14,5) ± 1,1 µm; **E** – 22,1 (22,9 – 21,3) ± 0,7 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, lisa, espessura de 3,4 ± 0,0 µm, medida em corte ótico meridional (c.o.m.), nas aberturas.

v. Figura 5, A e B.

Família: Rhamnaceae

Espécie: *Rhamnus alaternus*.

Forma: Subesferoidal, hexagonal na vista equatorial.

Tamanho: **P** – 24,2 (26,8 – 20,4) ± 4,0 µm; **E** – 25,8 (28,1 – 21,3) ± 4,6 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, reticulada, espessura de 1,7 ± 0,1µm, medida em c.o.m., no equador.

v. Figura 6, C e D.

Família: Fagaceae

Espécie: *Castanea sativa*.

Forma: Prolado.

Tamanho: **P** – 11,7 (11,1 – 12,8) ± 0,8 µm; **E** – 7,5 (8,5 – 6,8) ± 0,8 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, rugulada, espessura de 0,9 ± 0,0 µm, medida em corte ótico equatorial. (c.o.e), no equador.

v. Figura 6, E e F.

Família: Rosaceae

Espécie: *Rubus ulmifolius* Schott.

Forma: Subprolado.

Tamanho: **P** – 20,4 (22,9 – 18,7) ± 2,0 µm; **E** – 17,7 (19,5 – 15,3) ± 1,9 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, estriada, espessura de 1,7 ± 0,1µm, medida em c.o.e., no equador.

v. Figura 6, G e H.

Família: Salicaceae

Espécie: *Salix spp.*

Forma: Subprolado.

Tamanho: **P** – 22,5 (23,8 – 21,7) ± 1 µm; **E** – 17,5 (17 – 17,85) ± 0,5 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, reticulada, espessura de 1,7 ± 0,0 µm, medida em c.o.e., no polo.

v. Figura 6, I e J.

Família: Fabaceae

Espécie: *Trifolium repens*

Forma: Subprolado.

Tamanho: **P** – 27 (28,9 – 23,8) ± 2,7 µm; **E** – 21,6 (23,8- 17,85) ± 3,2 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, reticulada, espessura de 1,7 ± 0,0 µm, medida em c.o.e., no equador.

v. Figura 7, K e L.

Família: Brassicaceae

Espécie: **Tipo** *Raphanus raphanistrum*

Forma: Proladoesferoidal.

Tamanho: **P** – 25,33 (31,5 – 22,9) ± 4,1 µm; **E** – 23,5 (28,9 – 18,7) 4,4 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Semitetada, reticulada, espessura de 1,7 ± 0,0 µm, medida em c.o.e., no equador.

v. Figura 7, M e N.

Família: Rosaceae

Espécie: *Prunus persica*

Forma: Subprolado.

Tamanho: **P** – 30,26 (32,3 – 28,9) ± 1,5 µm; **E** – 27,2 (21,5- 25,5) ± 2,8 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, estriada de espessura de 1,7 ± 0,0 µm, medida em c.o.e., no equador.

v. Figura 7, O e P.

Família: Fagaceae

Espécie: *Quercus robur*

Forma: Subprolado.

Tamanho: **P** – 25,33 (27,5 – 23,1) ± 2,1 µm; **E** – 21,5 (22,1 – 20,8) ± 0,7 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, verrugosa, espessura de 1,7 ± 0,0 µm, medida em c.o.e., nos polos.

v. Figura 7, Q e R.

Família: Ericaceae

Espécie: *Erica umbellata* L.

Forma: Oblado esferoidal.

Tamanho: **P** – 32,6 (35,7 – 28,9) ± 3,2 µm; **E** – 33,7 (37,4– 32,3) ± 2,6 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, verrugosa, espessura de 2,5 ± 0,1µm, medida em c.o.e., no equador.

v. Figura 8, S e T.

Família: Boraginaceae

Espécie: *Echium plantagineum*

Forma: Subprolado.

Tamanho: **P** – 13,1 (11,9 – 13,6) ± 0,9 µm; **E** – 10,5 (9,35– 11,1) ± 0,9 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Tetada, reticulada, espessura de 0,9 ± 0,0 µm, medida em c.o.e., nos polos.

v. Figura 8, U e V.

Família: Fabaceae

Espécie: *Cytisus striatus*

Forma: Subprolado.

Tamanho: **P** – 29,6 (32,3 – 28,1) ± 1,9 µm; **E** – 26,18 (28,9 – 22,1) ± 3,6 µm

Abertura: Trizonocolporado

Exina: Semitetada, reticulada, espessura cerca de 1,7 ± 0,0µm, medida em c.o.e., no equador.

v. Figura 8, W e X.

As imagens das figuras 5 a 8, que se seguem, foram tiradas em MEV, para ilustrar de forma mais detalhada a morfologia dos tipos polínicos mais abundantes. Estas permitiram estudar com mais pormenor a morfologia da exina e foram importantes na definição dos tipos de méis neste estudo (excetuam-se as espécies I, J e Q, R porque são apenas políniferas), visto que, ao baixar a categoria do grupo taxonómico (por exemplo de género para espécie), a distinção dos tipos polínicos torna-se cada vez mais complexa, e exige mais detalhe.

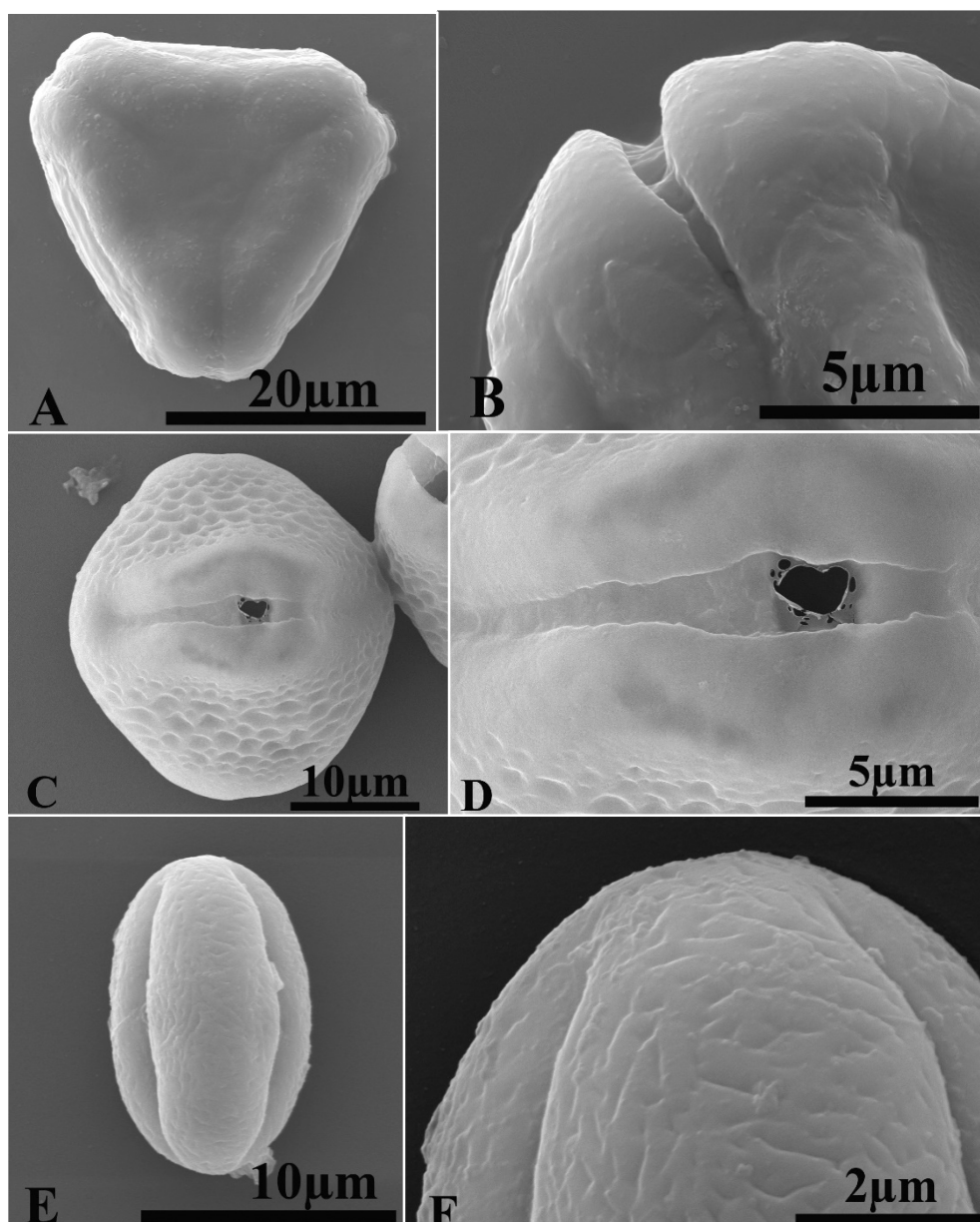


Figura 5 – **A, B** – *Eucalyptus globulus* (**A** – vista polar, **B** – pormenor da abertura e superfície da exina); – **C, D** – *Rhamnus alaternus* (**C** – vista equatorial e pormenor das aberturas; **D** – pormenor da superfície da exina); **E, F** – *Castanea sativa* (**E** – vista equatorial; **F** – Pormenor da exina).

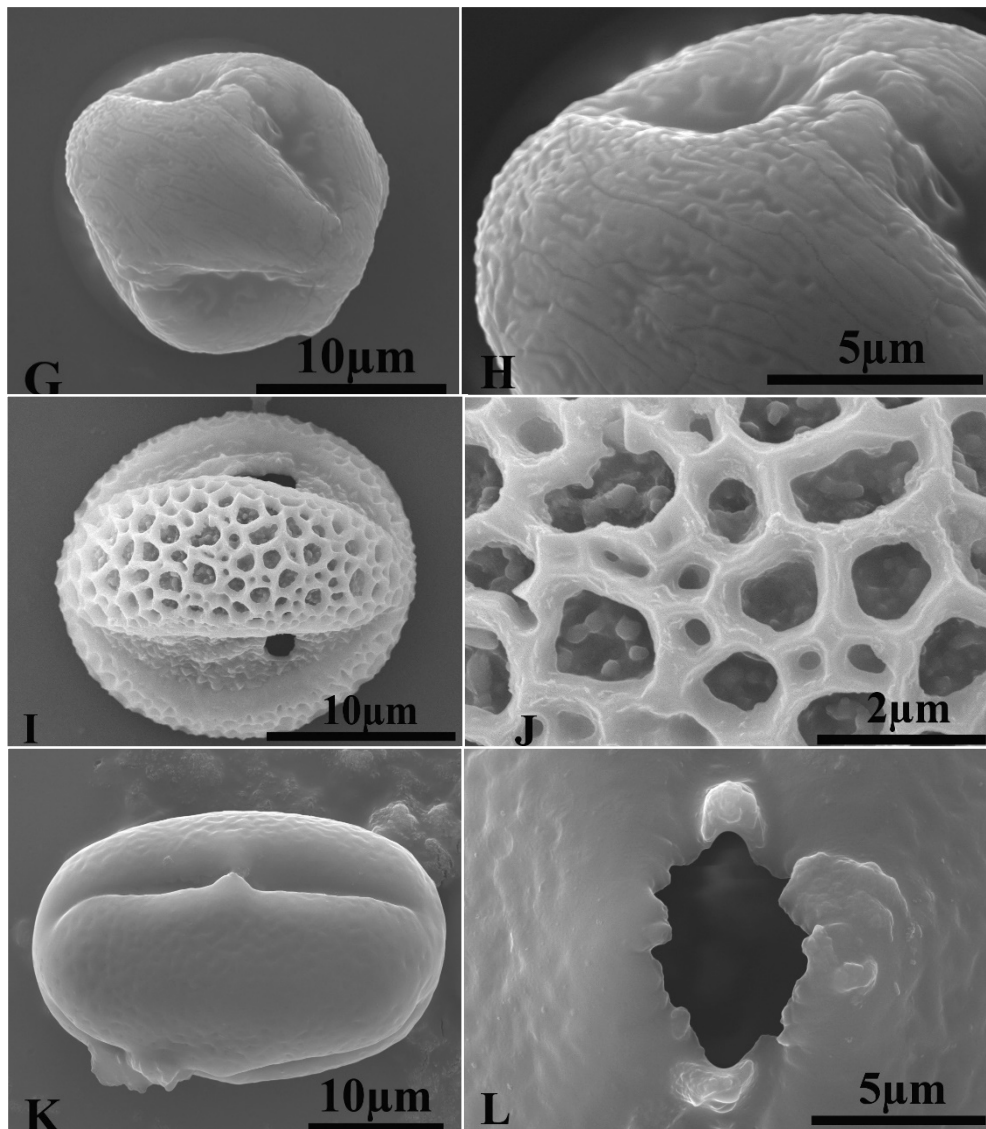


Figura 6 – **G, H** – *Rubus ulmifolius* (**G** – vista equatorial; **H** – pormenor da exina e abertura); **I, J** – *Salix* sp. (**I** – vista equatorial e pormenor da abertura e da exina); **K, L** – *Trifolium repens* (**K** – vista equatorial; **L** – pormenor da superfície da exina e abertura).

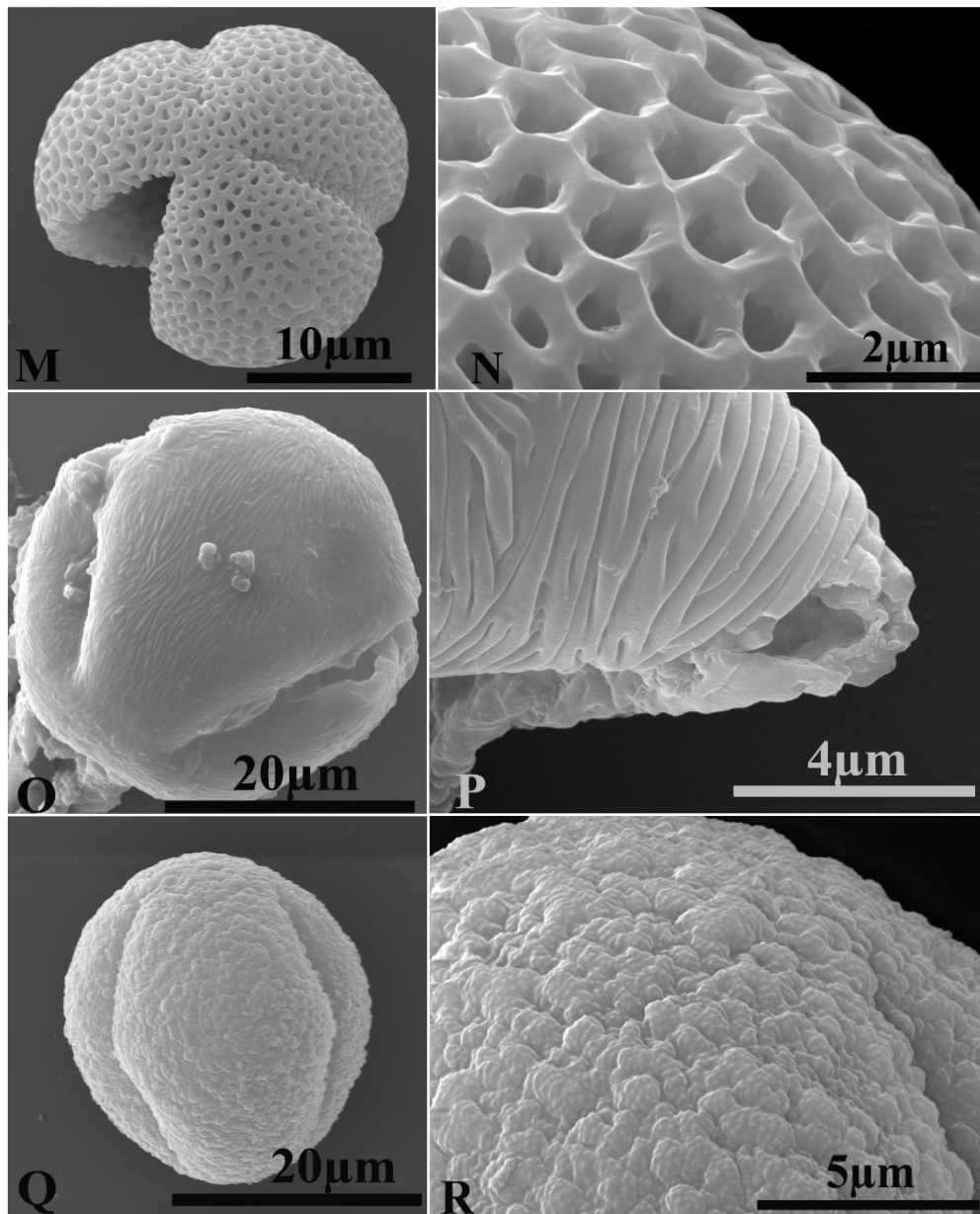


Figura 7 – **M, N** – Tipo *Raphanus raphanistrum* (**M** – vista polar e pormenor da abertura; **N** – pormenor da superfície da exina); **O, P** – *Prunus persica* (**O** – vista equatorial; **P** – pormenor da abertura e superfície da exina); **Q, R** – *Quercus robur* (**Q** – vista equatorial; **R** – pormenor da superfície da exina).

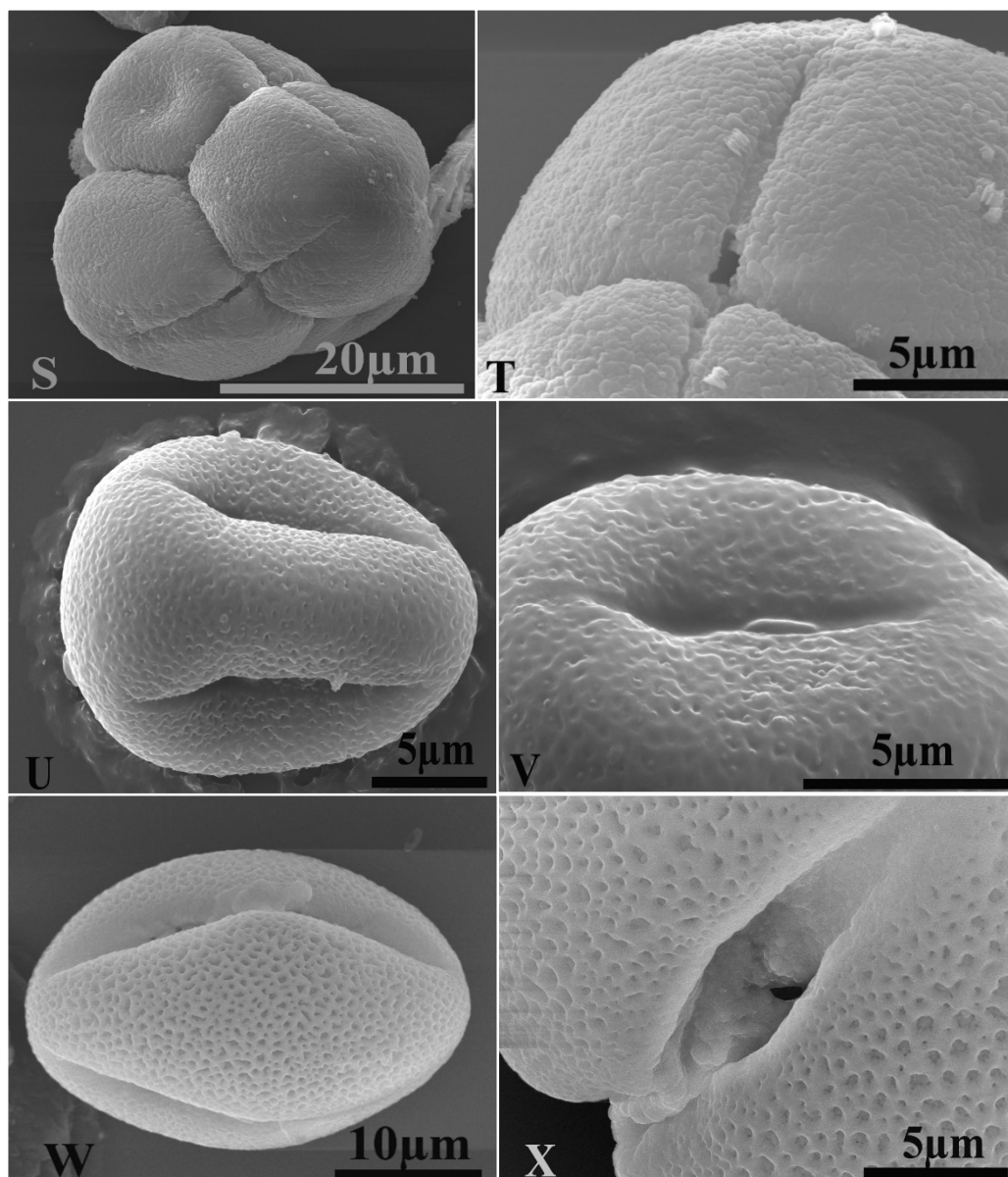


Figura 8 – S, T – *Erica umbellata* (S – vista equatorial; T – pormenor da abertura e ornamentação da exina); U, V – *Echium plantagineum* (U – vista equatorial; V – pormenor da abertura e ornamentação da exina); W, X – *Cytisus striatus* (W – vista equatorial; X – pormenor da abertura e ornamentação da exina).

Nas Fig. 9 e 10 seguem-se imagens obtidas através de microscopia ótica (MO) das mesmas espécies mais representativas.

Dos géneros *Aesculus*, *Sedum*, *Acacia*, *Oenanthe*, *Lythrum*, *Pterospartum*, *Hedera*, *Malus*, *Genista*, *Crataegus* e *Cistus*, bem como do Tipo A19, que apresentaram uma representatividade intermédia, apresentam-se, nas figuras 11, 12 e 13, imagens em M.O., pois as suas imagens não foram obtidas por técnica de MEV.

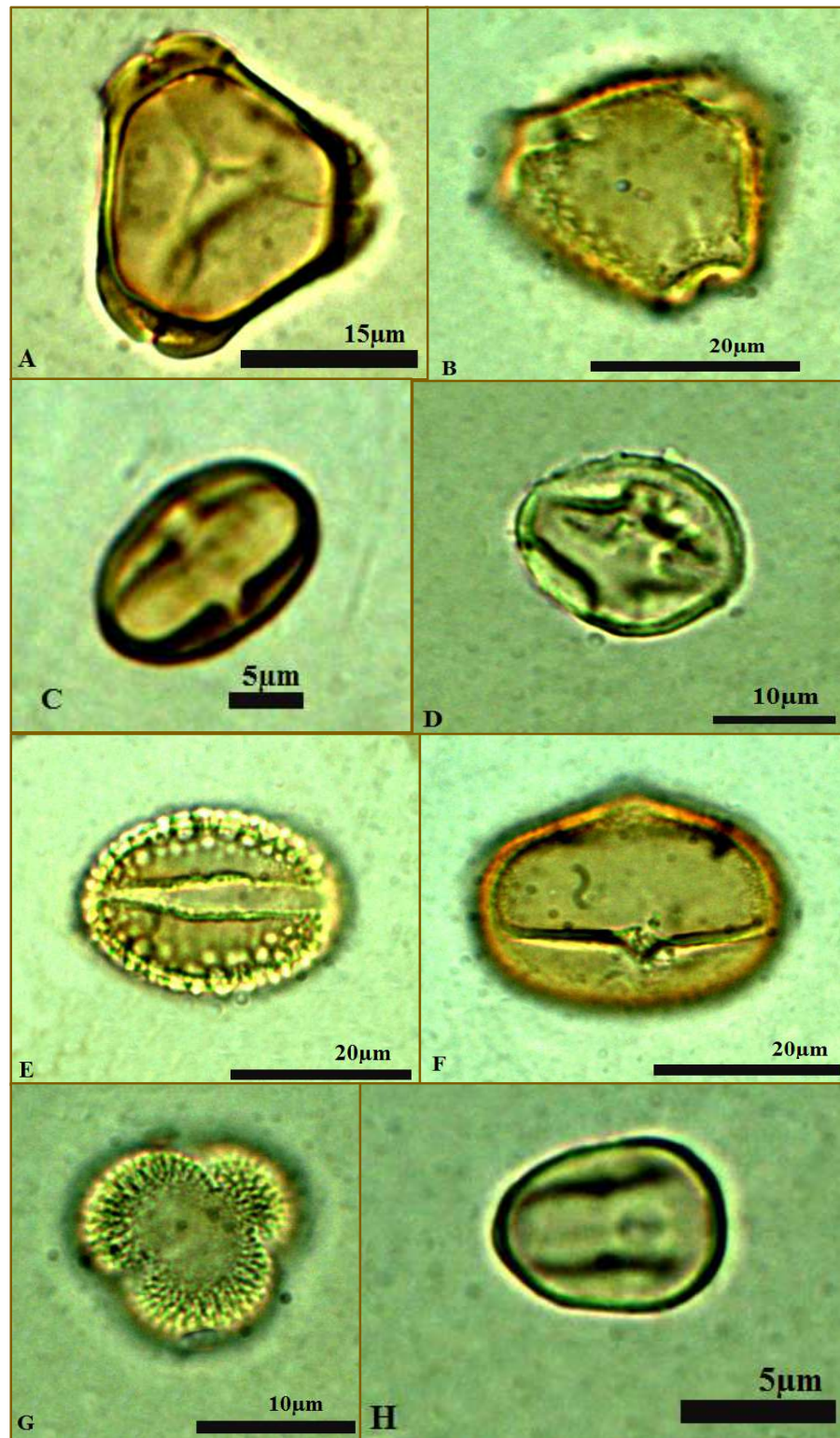


Figura 9 – **A** – *Eucalyptus globulus* (vista polar); **B** – *Rhamnus alaternus* (vista equatorial); **C** – *Castanea sativa* (Vista equatorial); **D** – *Rubus ulmifolius* (vista equatorial); **E** – *Salix* spp. (Vista equatorial e colpo pormenorizado), **F** – *Trifolium repens* (vista equatorial e colpo pormenorizado); **G** – *Raphanus raphanistrum* (vista polar); **H** – *Echium plantagineum* (vista equatorial).



Figura 10 – **I** – *Prunus persica* (vista polar); **J** – *Quercus robur* (vista equatorial); **K** – *Erica umbellata* (vista equatorial).

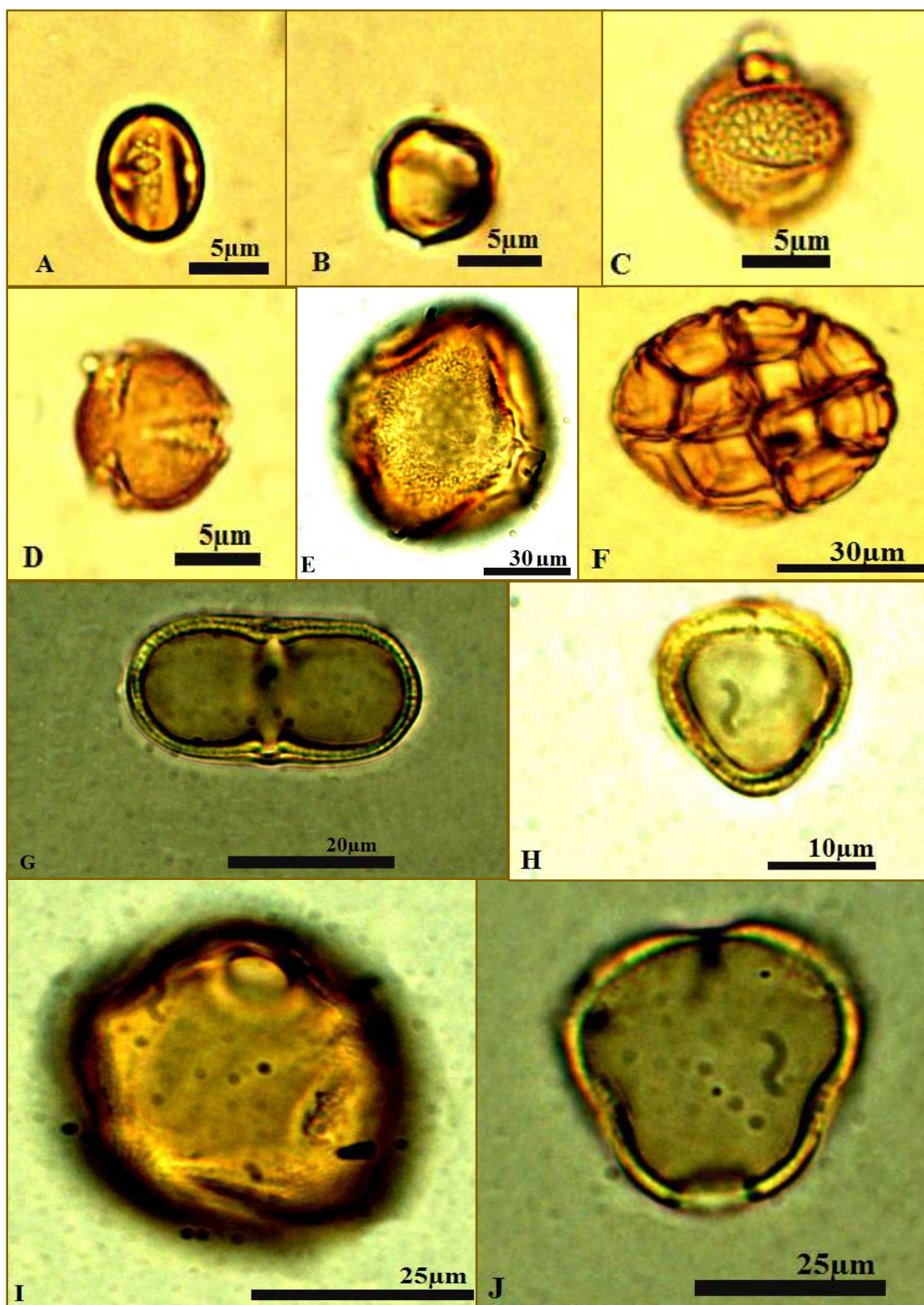


Figura 11 – **A, B** – *Aesculus hippocastanum* (**A** – vista equatorial; **B** – vista polar); **C, D** – *Sedum* spp. (**C** – vista equatorial e ornamentação da exina; **D** – vista polar e aberturas); **E** – Tipo A 19 (vista equatorial); **F** – *Acacia melanoxylon* (vista equatorial); **G, H** – *Oenante crocata* (**G** – vista equatorial; **H** – Vista polar); **I, J** – *Lythrum* spp. (**I** – vista equatorial; **J** – vista polar).

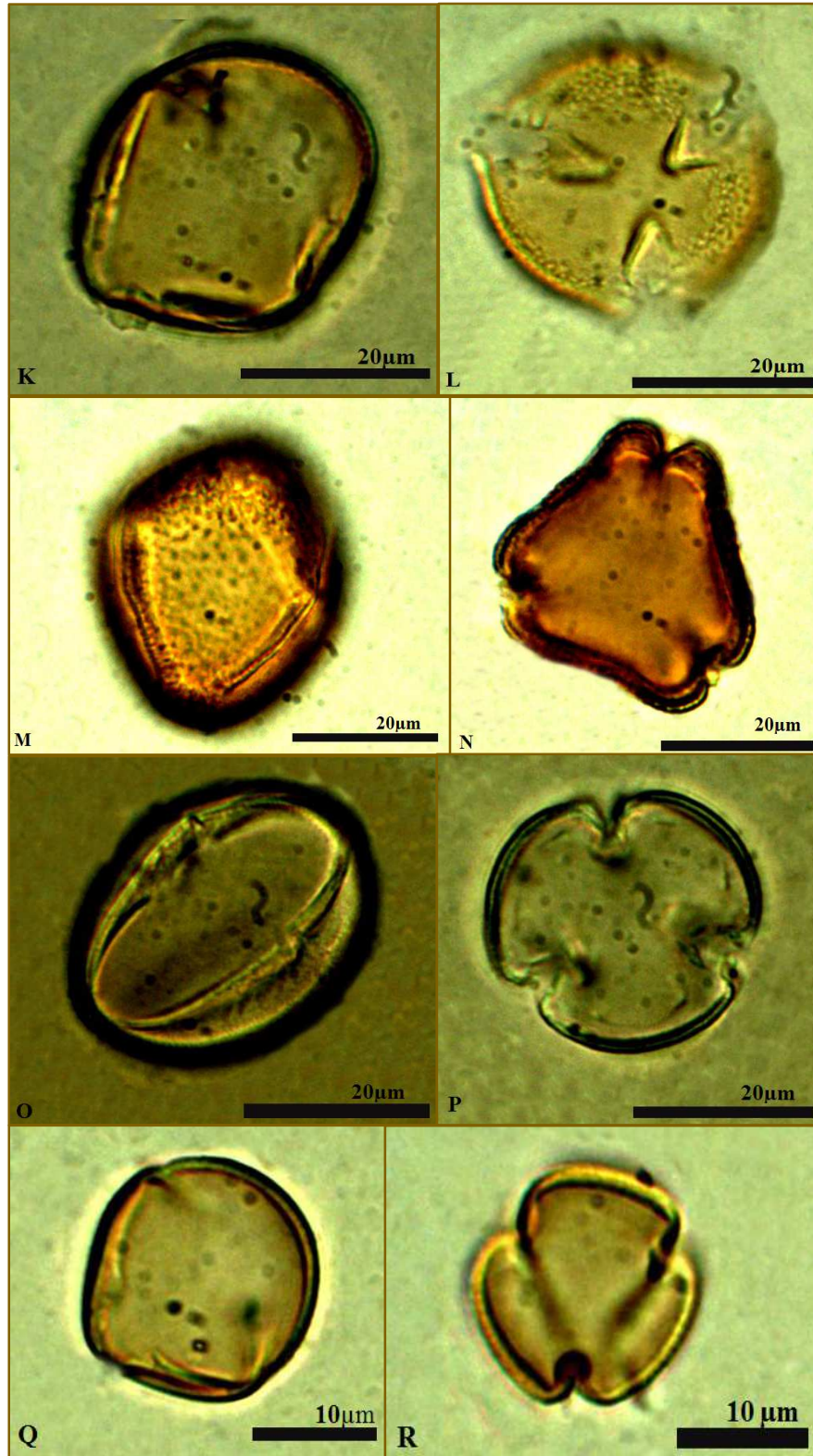


Figura 12 – **K, L** – *Pterospartum tridentaum* (**K** – vista equatorial; **L** – vista polar); **M, N** – *Hedera* spp. – (**M** – vista equatorial e ornamentação da exina; **N** – vista polar); **O, P** *Malus* spp.– (**O** – vista equatorial; **P** – vista polar); – **Q, R** – *Genista* spp. – (**Q** – vista equatorial; **R** – vista polar)

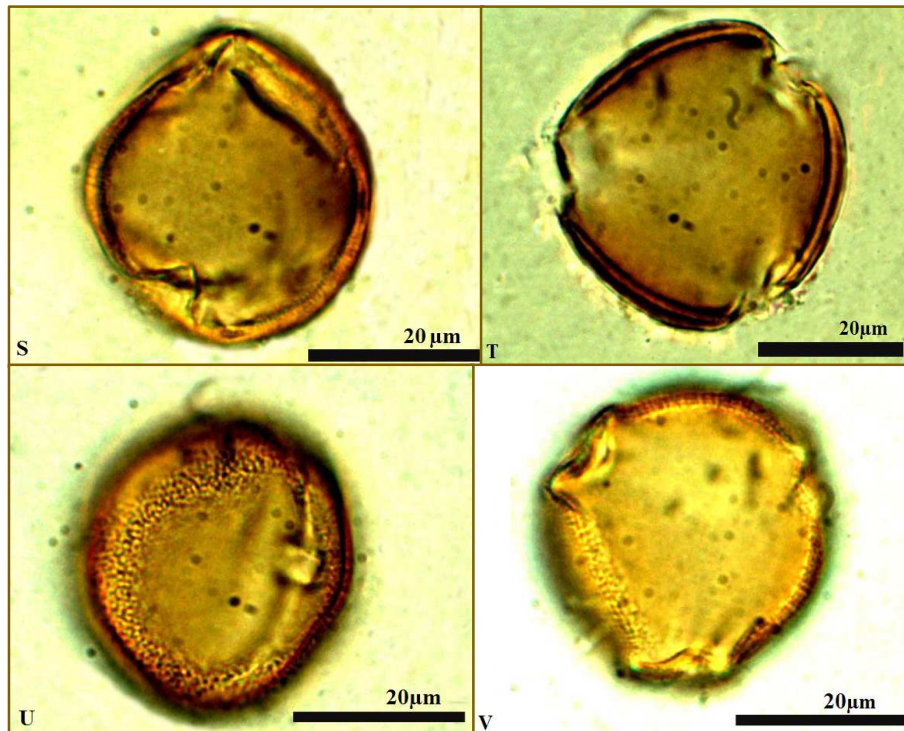


Figura 13 – S, T – *Crataegus monogyna* – (S – vista equatorial; T – vista polar), U, V – *Cistus* spp. – (U – vista equatorial; V – vista semi-polar).

Uma das formas de apresentar os resultados é com base nas classes de frequência polínica individuais e é possível destacar-se D – *pólen dominante* (acima de 45%), S – *pólen secundário* (16 – 45%), M – *pólen minoritário* (3 – 15%) e a classe de R – *pólen raro* (abaixo de 3%) (Louveaux *et al*, 1978; Campos, 1998; Sorkun & Dogan, 1995). Porém, das análises feitas, constata-se uma grande variação dessas classes de frequências em relação as amostras estudadas e a Tabela VII, descreve claramente como esta variação se manifesta.

Tabela VII – Distribuição e abundância de pólen de plantas melíferas na Serra do Buçaco, cresta de Julho de 2014.

Espécies	Amostras de mel									
	Ca	Bo	Su	Te	Es	Cv	Mi	MB	Lu	LP
<i>Eucalyptus globulus</i>	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
<i>Sedum</i> spp.	---	---	---	---	---	---	R	R	R	---
<i>Echium</i> spp.	---	---	---	R	R	R	---	R	R	M
<i>Erica</i> spp	M	R	R	R	---	M	---	R	M	M
<i>Rhamnus alaternus</i>	M	M		S	M	M	R	R	R	R
<i>Genista</i> spp.	---	R	R	R	R	---	R	R	---	R
<i>Cistus</i> spp.	R	R	R	---	R	---	R	R	R	R
<i>Salix</i> spp.	R	M	R	R	R	---	---	R	R	---
<i>Quercus robur</i>	---	R	---	---	---	R	---	R	---	R
<i>Aesculus hippocastanum</i>	R	---	---	---	R	---	---	---	R	R
Tipo A19	---	---	---	R	---	---	---	---	---	---
<i>Rubus ulmifolius</i>	M	---	R	R	R	R	R	R	M	M
<i>Acacia melanoxylon</i>	---	---	---	R	R	R	R	R	R	R
<i>Hedera</i> spp.	---	---	---	R	R	R	---	---	---	R
<i>Castanea sativa</i>	---	R	---	R	---	R	R	R	S	S
<i>Pterospartum tridentatum</i>	---	---	---	M	---	R	M	---	R	R
<i>Oenanthe crocata</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	M
Tipo <i>Raphanus raphanistrum</i>	M	R	R	M	R	M	M	M	M	R
<i>Malus</i> spp.	---	---	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Prunus</i> spp.	M	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Trifolium repens</i>	M	R	R	R	M	R	R	R	R	R
Tipo <i>Cytisus</i>	---	---	---	M	R	R	M	---	R	R
<i>Lythrum</i> spp.	R	---	---	---	R	R	---	R	R	R
<i>Crataegus monogyna</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	---
<i>Lavandula</i> spp.	R	---	---	R	R	R	---	---	---	---
<i>Rosmarinus</i> spp.	---	---	---	R	---	---	---	---	---	---
<i>Thymelaea</i> spp.	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Tipo <i>Crepis</i>	R	---	R	---	---	R	---	---	---	R
<i>Cardus</i> spp.	---	---	---	---	---	R	---	---	---	---
<i>Helianthus annuus</i>	---	---	---	---	R	R	---	---	---	R
<i>Taraxacum vulgare</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	R
<i>Chrysanthemum coronarium</i>	---	---	---	---	---	R	---	---	---	---
<i>Silene</i> spp.	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Olea europaea</i>	R	---	R	R	R	R		R	R	R
<i>Foeniculum vulgare</i>	---	---	---	R	---	---	---	---	R	R
<i>Reseda</i> spp.	R	---	---	---	R	---	---	R		R
<i>Euphorbia</i> spp.	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Alnus</i> spp.	---	---		R	---	---	---	---	---	---
<i>Betula pendula</i>	---	R	R	R	R	R	---	---	R	---
<i>Scrophularia</i> spp.	---	---	---	R	---	---	---	---	---	R

Tabela VII, Continuação.

	Amostras de mel									
	Ca	Bo	Su	Te	Es	Cv	Mi	MB	Lu	LP
<i>Tilia</i> sp.	R	R	---	---	---	---	R	---	---	---
<i>Diploaxis</i> spp.	---	---	---	---	R	---	---	---	---	---
<i>Calluna vulgaris</i>	R	R	---	---	R	R	---	R	---	R
<i>Arbutus unedo</i>	---	---	---	---	---	R	---	---	---	---
<i>Asphodelus</i> spp.	---	---	---	---	---	R	---	---	---	R
<i>Vitis vinifera</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	R
<i>Vicia faba</i>	---	---	---	R	---	---	R	---	---	---
<i>Lotus</i> spp.	---	R	R	---	---	---	---	---	---	R
<i>Halimium</i> spp.	---	R	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Plantago lanceolata</i>	---	---	R	---	---	R	---	R	R	R
<i>Ilex aquifolium</i>	---	---	R	---	---	---	---	---	---	R
<i>Lysimachia vulgaris</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	R	---
<i>Myrtus communis</i>	R	---	---	---	---	---	---	---	---	---
<i>Galactites tomentosa</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	R

D - pólen dominante, M - pólen minoritário e R - pólen raro.

Verifica-se que, em todas amostras, o pólen dominante é o de *Eucalyptus* spp., representado com uma percentagem acima dos 45%, com exceção da amostra de Luso e L. de S. Pedro. Das espécies cujo pólen é minoritário, importa referir a *Raphanus raphanistrum*, pois, esta espécie, depois do *Eucalyptus* é a que se mostra melhor distribuída ao longo da serra, visto que a sua presença é verificada em 7, das 10 áreas amostradas. Por outro lado, a classe de pólen secundário é dominada pela *Castanea sativa* e por *Eucalyptus* spp., nas regiões de Luso e L. de S. Pedro (Tabela VII).

4.2 Análises físico-químicas

4.2.1 Humidade

O teor de água no mel é uma característica verdadeiramente importante, porque influencia a sua maturidade, conservação, sabor, peso específico, cristalização, viscosidade e cor (Pérez, 2003).

O valor máximo exigido pela união europeia para um mel floral é de 20%, em geral (Diretiva 110/CE, 2001), mas para as Nações Unidas, para que um mel se posicione nos primeiros graus de qualidade (US grade A e B), a humidade não deve ultrapassar os 18,6%. No entanto, estes valores revelam limites e não representam o teor de humidade adequado para o mel porque se este produto tiver mais de 17% de humidade e conter um número suficiente de esporos de fungos, este vai fermentar (White *et al.*, 1980).

Contudo, o valor médio de humidade encontrado nas 10 amostras de mel varia entre 15,5 e 17,8%, como se verifica na tabela VIII. Portanto, estas amostras podem ser consideradas de primeiro grau (US grade A) pelas nações unidas e, segundo a norma europeia, está dentro do padrão exigido ($\leq 20\%$). Apesar disto, é importante referir que as amostras de Telhado e Luso apresentaram valores de humidade mais baixa e as que apresentaram valores mais elevados foram Carreira, Botão, Sula e Miro, a rondarem em média entre os 17% e os 17,8% (Tabela VIII). Todavia, comparativamente aos valores de humidade dos méis das zonas tropicais, estes valores não diferem bastante pois, segundo Perez, (2003), o clima, a humidade ambiental e edáfica, a flora, a zona geográfica e a abundância da fonte de nectar bem como as práticas apícolas utilizadas são determinantes. Adicionalmente a isto, num estudo feito por Alves *et al.*, (2013), para várias regiões de Portugal, os valores da humidade foram, em média, 15,4-20,5%, valores similares aos da Guiné Bissau encontrados por Lopes, (2014) de 15,5-19,6 %.

4.2.2 Cor

Como foi descrito na revisão da literatura, o mel apresenta uma gama de variações na sua tonalidade cromática e o apicultor usa esta gama de informação para tipificar o seu mel. De acordo com a escala Pfund de faixa de cor, a informação cromática dos méis analisados variou entre Ambar escuro, para 6 amostras, âmbar claro, para 3, e âmbar, para uma, cujos valores de referências são indicados na Tabela VIII.

Portanto, essas diferenças têm a ver com a sua origem botânica, que reflete-se em maior valor nutritivo dos méis escuros. Mas em termos de qualidade, as diferenças de cor não refletem obrigatoriamente um mel de melhor ou pior qualidade. A este fator de escurecimento, estão também associadas as reações de Maillard e a temperatura na qual o mel amadurece. De forma geral, os méis mais escuros apresentam aroma e sabor mais intensos e contêm sais minerais em maiores percentagens enquanto os méis mais claros são leves em termos de sabor e aroma (Avallone *et al.*, s.d.).

4.2.3 Condutividade elétrica

O valor da condutividade elétrica em amostras de mel depende do conteúdo mineral, proteínas, ácidos orgânicos, pH, conteúdo em cinzas, açúcares e outros iões lá existentes (Silva *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2011). Este parâmetro pode inferir a origem botânica do mel, discriminando o mel de néctar e de melada bem como caracterizar os méis monoflorais (Silvano *et al.*, 2014). Assim, valores de condutividade elétrica de méis

superiores a $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ enquadram-se na classe de meladas e valores inferiores a $800 \mu\text{Scm}^{-1}$ são enquadrados na classe de méis de néctar ou mistura desses (Belay *et al.*, 2013).

Tabela VIII – Valores dos parâmetros físico-químicos: humidade, cor e a condutividade elétrica de méis da Serra do Buçaco.

Amostras	Humidade (%)	Cor (Pfund)	Condutividade elétrica (μScm^{-1})	
Carreira	17,0	126,3	Âmbar escuro	632,7
Botão	17,3	150,0	Âmbar escuro	579,0
Sula	17,5	117,3	Âmbar escuro	543,7
Telhado	15,5	61,7	Âmbar claro	455,7
Espinheira	16,8	74,0	Âmbar claro	581,7
Carvalho	16,9	150,0	Âmbar escuro	726,7
Miro	17,8	106,3	Âmbar	534,3
Mata do Buçaco	17,3	150,0	Âmbar escuro	506,0
Luso	15,9	76,0	Âmbar claro	757,3
L. de S. Pedro	16,9	150,0	Âmbar escuro	708,7

Os resultados encontrados para as 10 amostras estão abaixo dos $800 \mu\text{Scm}^{-1}$, variando entre $455,7 \mu\text{Scm}^{-1}$ e $757,3 \mu\text{Scm}^{-1}$ (Tabela VIII). Estes dados coincidem com os resultados obtidos pelas 5 das 10 amostras da análise melissopalínológica, que indicam serem méis de néctar.

De acordo com Gomes *et al.*, (2011) quando se compara os méis de nordeste de Portugal (Mogadouro, Milhão, Angueira, Bragança e Vinhais), em que os valores da condutividade variaram entre 90 a $430 \mu\text{Scm}^{-1}$, conclui-se que os méis da Serra do Buçaco têm valores relativamente mais elevados e por conseguinte, maior concentração relativa de matéria mineral. Estes resultados podem estar associados a divergências de origem botânica visto que, as amostras de nordeste de Portugal foram de origem monofloral de *Erica* sp., *Lavandula* sp. *Echium* sp. e *Rubus* sp., diferente da origem botânica dos méis em estudo.

4.2.4. Acidez

Os ácidos orgânicos contribuem para apenas 0,5% da composição do mel. No entanto, contribuem para o seu sabor característico e os seus valores normais são indicadores da ausência de fermentação indesejável visto que, leveduras xerotolerantes podem aumentar a acidez deste produto (Barbosa, 2012).

A acidez é um parametro de extrema importância no teste de qualidade do mel porque, para além de conferir estabilidade perante a propagação de microrganismos no mel (Malika *et al.*, 2005), fornece dados sobre as características químicas e sensoriais (Finco *et al.*, 2010). Portanto, fez-se no presente trabalho a avaliação deste parâmetro mediante a medição do pH, da acidez livre, bem como da acidez lactónica e da acidez total.

O valor de pH não está padronizado pela legislação europeia, mas informa sobre o estado químico do mel. No conjunto das amostras analisadas este parâmetro mostrou variações entre 3,6 e 4,1 (Tabela IX), o que revela um carácter ácido suave. Os valores de pH encontrados neste estudo, são consistentes com os valores de pH dos méis monoflorais europeus publicados (Oddo *et al.*, 1990; Iglesias *et al.*, 2012) e mesmo com valores de méis da região tropical da Guiné-Bissau (Lopes, 2014), o que vem a confirmar os valores médios de pH frequentemente encontrados no mel.

Em relação à acidez livre, como foi descrito na metodologia, determinou-se em relação ao ponto de equivalência e a pH fixo de 8,3. No primeiro caso, variou entre 13,4 meqkg⁻¹ e 26,5 meqkg⁻¹, enquanto no segundo, variou de 19,1 meqkg⁻¹ a 36,4 meqkg⁻¹ (Tabela IX).

Contudo, como o valor máximo permitido é de 50 meqkg⁻¹ no geral e, em particular para o uso industrial, cerca de 80 meqkg⁻¹ (Diretiva 110/CE, 2001), pode-se concluir que estes méis não apresentam níveis de fermentação indesejáveis. Ainda assim, os valores da acidez lactónica foram também baixos, variando entre 12,7 meqkg⁻¹ e 23,1 meqkg⁻¹, o que se refletiu nos valores da acidez total, que foram inferiores a 50 meqkg⁻¹. Adicionalmente, Alves *et al.*, (2013) encontraram resultados similares a uma gama de amostras contudo, duas amostras da região sul de Portugal, Faro, tiveram resultados da acidez livre, superior ao limite estabelecido, com cerca de 61,1 e 69,5 meq/kg⁻¹.

Tabela IX– Valores dos parâmetros físico-químicos relacionados com a acidez: pH, acidez livre a pH 7, acidez livre a pH 8,3, acidez lactónica e acidez total, dos méis da Serra do Buçaco.

Amostras	pH inicial	Acidez livre a pH 7 (meqKg ⁻¹)	Acidez livre a pH 8,3 (meqKg ⁻¹)	Acidez lactónica (meqKg ⁻¹)	Acidez total (meqKg ⁻¹)
Carreira	3,9	15,5	21,2	13,5	29,0
Botão	3,8	15,9	23,7	16,4	32,3
Sula	3,9	13,4	19,1	15,3	28,8
Telhado	3,8	14,2	19,2	13,6	27,8
Espinheira	3,9	13,2	18,0	12,7	26,0
Carvalho	4,0	21,7	30,8	18,1	39,8
Miro	3,6	26,5	36,4	23,0	49,4
Mata do Buçaco	3,6	23,2	34,6	23,1	46,3
Luso	4,1	16,5	22,3	15,6	32,1
L. de S. Pedro	3,9	23,3	32,4	20,3	43,6

4. 2. 5 HMF, índice diastásico e prolina

O néctar, normalmente, não apresenta HMF, por esta razão, quando aparece no mel, este é utilizado como um indicador de qualidade e frescura. O aumento deste fenol cíclico no mel deve-se a elevação da temperatura e humidade, bem como a adição de açúcares invertidos ou mesmo um armazenamento inadequado (Downey *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009). Mas a simples existência de açúcares no mel, tais como a glucose e frutose em degradação e em contato com acidez, condiciona a sua formação (Khalil *et al.*, 2010).

O limite máximo estabelecido e em vigor na união europeia é de 40 mgKg⁻¹ com exceção dos méis da região tropical onde, devido às temperaturas mais elevadas, este valor pode atingir de forma natural os 80 mgkg⁻¹, sem que este seja causado por adulterações ou sobreaquecimento (CCS, 2001; Khalil *et al.*, 2010). A Tabela X mostra os resultados obtidos neste estudo.

Os resultados para este parâmetro neste trabalho oscilaram entre 1,2 mgkg⁻¹ e 31,6 mgkg⁻¹, tendo os valores mais altos sido registados para a amostra de Miro, com 17,1mgkg⁻¹, e L de S. Pedro, com 31,6 mgkg⁻¹ (Tabela X). No entanto, nenhuma amostra

apresentou valores acima dos limites estabelecidos e, assim, pode-se concluir que essas amostras não tiveram problemas de adulterações e sobreaquecimento.

Tabela X – Valores dos parâmetros de qualidade do mel da Serra do Buçaco: hidroximetilfurfural, índice diastásico e prolina.

Amostras	HMF (mgkg⁻¹)	Índice diastásico (DN)	Prolina (mgg⁻¹)
Carreira	11,3	12,3	0,78
Botão	2,5	8,7	0,41
Sula	4,3	9,8	0,43
Telhado	1,2	10,6	0,48
Espinheira	8,4	9,7	0,69
Carvalho	14,5	15,4	0,87
Miro	17,1	14,2	0,95
Mata do Buçaco	12,6	8,7	0,27
Luso	3,9	12,2	0,55
L. de S. Pedro	31,6	15,1	0,99

A diástase é muito sensível ao calor e assim, o seu índice, pode indicar o grau de sobreaquecimento, conservação e frescura do mel (Silva *et al.*, 2009; White, 1994). Por exemplo, a sujeição do mel a temperaturas superiores a 60°C provoca a desnaturação e o consequente decréscimo da mesma (White, 1994; Tosi *et al.*, 2008). A sua ausência reflete fraude realizada no mel.

Ademais, quanto mais alto for o teor de HMF por degradação do mel, mais baixo ou ausente será o valor da enzima diástase (Tosi *et al.*, 2008). No entanto, há méis com teor de HMF não superior a 15 meqkg⁻¹ e com baixos teores enzimáticos reconhecidos, no caso de méis do género *Citrus*, é exigido um índice diastásico no mínimo de 3 unidades na escala de Schade (DN). Mas em geral, com exceção de mel para o uso industrial é no mínimo exigido 8 DN (Bogdanov *et al.*, 2002; Diretiva 110/CE, 2001; Tosi *et al.*, 2008).

O valor encontrado nas análises das 10 amostras variou entre 8,7 DN a 15,4 DN (Tabela X), estando dentro do padrão exigido e refletindo um bom estado de conservação e frescura. Estes valores não são incomuns em amostras de méis visto que, Gomes *et al.*,

(2011) obtiveram em méis de nordeste de Portugal (Mogadouro, Milhão, Angueira, Bragança e Vinhais), valores relativamente altos que variaram em média entre 13,90 a 16,40 DN que indicavam uma boa frescura do mel.

Devido à sua abundância, a prolina reflete o nível de aminoácidos totais no mel e é utilizada como um critério de maturação e presença de adulterações com açúcares, visto que a presença destes diminui o teor da prolina. Em função da origem botânica, os valores mais comuns podem variar entre 0,25 mgg⁻¹ para méis claros como o da acácia e 0,60 mgg⁻¹ para o mel de castanheiro ou méis de meladas, sendo reconhecido que um mel genuíno ou seja, naturalmente maduro e sem adulterações, deverá exibir teores em prolina acima de 0,18 mgg⁻¹ (Bogdanov *et al.*, 2002).

Os resultados alcançados neste trabalho variaram entre 0,27 mgg⁻¹ e 0,99 mgg⁻¹, para os méis da Mata do Buçaco e Lameira de São Pedro, respetivamente. A média geral foi de 0,64 mgg⁻¹. Portanto, segundo (Truzzi *et al.*, 2014) estes méis podem ser considerados frescos, maduros e sem falsificação.

4. 2. 6 Perfil em açúcares

O perfil em açúcares tem sido explorado para distinguir os méis de melada dos de néctar (Sanz *et al.*, 2005). Assim sendo, a percentagem de frutose e glucose, em conjunto, não deve ser inferior a 60% para os méis de néctar, enquanto para os méis de melada não deve ser menor que 45% (Diretiva 110/CE, 2001; Sanz *et al.*, 2005).

Os valores encontrados nesta pesquisa para frutose, foram superiores aos da glucose. Os valores cumulativos de frutose + glucose superaram os 60%, situando-se entre 60% e 67,8% (Tabela XII). Assim, em concordância com a legislação internacional, pode-se certificar mais uma vez que as amostras de Carvalho, Miro, Mata do Buçaco, Luso e Lameira de São Pedro, foram formadas a partir de néctar. O mesmo foi comprovado pelos dados da condutividade elétrica e análise melissopalínológica quantitativa e qualitativa. As restantes amostras, tiveram valores similares de frutose+glucose e de condutividade elétrica, mas devido aos dados da análise melissopalínológica quantitativa, foram enquadrados no grupo de misturas de méis de néctar e de melada.

A sacarose está presente no mel (cerca de 1% do seu peso seco). No entanto, este nível pode ser aumentado se o apicultor tiver sobre-alimentado as abelhas com este açúcar (Anklam, 1998). Assim, a sacarose é utilizada como indicador de adulteração no mel, visto que, o teor acima dos 5% pode ser consequência de uma cresta precoce ou suplemento de xaropes de sacarose na alimentação das abelhas (Tornuk *et al.*, 2013). Portanto, neste estudo a ausência de sacarose nas 10 amostras verificada pelo método de cromatografia líquida (Figura 14), indica uma ausência total de adulterações.

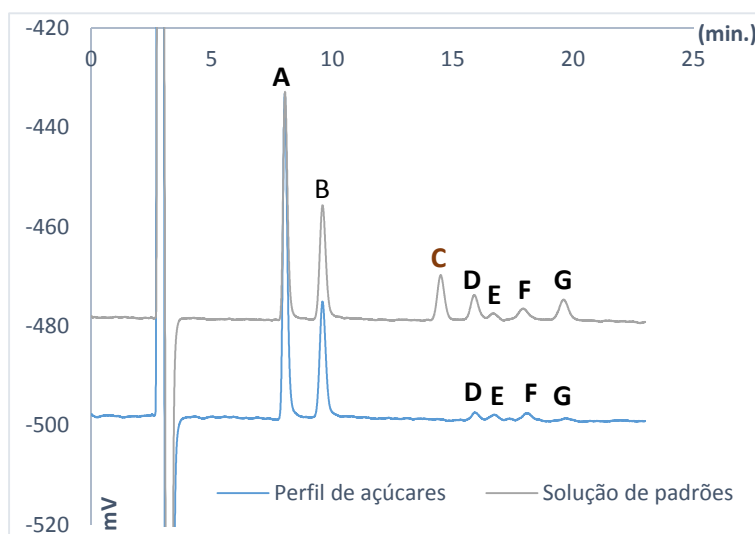


Figura 14 – Perfil de açúcares pela cromatografia líquida por HPLC ilustrando os 7 padrões de açúcares e os respectivos açúcares obtidos com exceção da sacarose, para o mel da Serra do Buçaco. **A**-Frutose, **B**-Glucose, **C** – Sacarose, **D** – Turanose, **E** – Maltulose, **F**- Maltose e **G** - Trealose.

Em relação aos dissacarídeos, a Figura 14 mostra a presença da Turanose, Maltulose, Maltose e Trealose embora em baixas quantidades, (Tabela XII). Valores similares foram encontrados em amostras de méis da Guiné - Bissau (Lopes, 2014).

Altas concentrações de diferentes hidratos de carbono no mel condicionam a viscosidade, higroscopicidade, densidade e a capacidade de cristalização (White *et al.*, 1980; Finco *et al.*, 2010). Estas propriedades são fundamentalmente influenciadas pela origem botânica e geográfica, mas também a sazonalidade, processamento e armazenamento as afetam (Escuredo *et al.*, 2013).

As proporções de Frutose/Glucose (F/G) e Glucose/Humidade (G/W) determinam o tempo de cristalização do mel e a relação G/W é boa indicadora da previsão de cristalização (v. Tabela XI) (Escuredo *et al.*, 2013).

Tabela XI– Alguns indicadores para avaliar a dinâmica de cristalização do mel.

Indicador	Cristalização			
	ausente	Rápida	lenta ou nula	rápida/completa
Razão G/W	< 1,7	>2,2	< 1,7	>2,0
Razão F/G	>1,3	< 1,1	Proporção média para ocorrer é de <1,2	
Referência	(Bonvehi, 1989 <i>in</i> Bhandari <i>et al</i> ,1999).		Escuredo <i>et al.</i> , (2013)	

As amostras em estudo tiveram valores da razão G/W a oscilarem entre 1,3 e 1,5 (Tabela XII), o que, segundo Escuredo *et al.*, (2013), sugere uma lenta ou nula tendência para a granulação. Já os valores encontrados em relação a F/G, para as 10 amostras, estão entre 1,6 a 2,0, acima dos valores de referência indicados na tabela XI. Estes valores sugerem alguma contradição com os dados da razão entre G/W, uma vez que comparando os valores de G/W com os valores de referência indicados por Escuredo *et al.*, (2013), seria expectável ocorrer alguma cristalização nas amostras de G/W mais elevado, já considerando os valores de F/G não seria de esperar qualquer cristalização. Contudo, foi observado que no verão e inverno de 2015 e 2016, as 10 amostras cristalizaram parcialmente, como se pode observar nas fotos que se seguem (v. Figura 15), o que nos leva a considerar os dados da razão G/W como os mais fiáveis.



Figura 15 – Cristalização parcial de méis da Serra do Buçaco, observação de 2015 e 2016.

Tabela XII – Valores de perfil em açúcares de méis da Serra do Buçaco, obtido por cromatografia líquida em HPLC. Resultados expressos em %, equivalentes a g/100g de mel

Amostras	Frutose	Glucose	Sacarose	Turanose	Maltulose	Maltose	Trealose	Fru+Glu	Fru/Glu	Glu/Hum
Carreira	39,7	23,1	-	2,3	1,3	2,4	0,3	62,9	1,7	1,4
Botão	43,7	22,0	-	1,3	1,0	2,5	0,3	65,7	2,0	1,3
Sula	39,7	22,1	-	1,4	1,1	2,9	0,2	61,8	1,8	1,3
Telhado	41,4	23,6	-	1,6	1,2	3,9	0,3	65,0	1,8	1,5
Espinheira	38,8	22,1	-	1,5	1,5	3,5	0,3	61,0	1,8	1,3
Carvalho	41,3	21,5	-	1,5	1,8	3,0	0,4	62,8	1,9	1,3
Miro	39,2	24,9	-	1,1	0,7	2,2	0,3	64,1	1,6	1,4
Mata do Buçaco	44,9	22,9	-	1,5	1,2	1,3	0,3	67,8	2,0	1,3
Luso	37,6	22,3	-	1,5	1,6	2,6	0,4	60,0	1,7	1,4
L. de S. Pedro	42,0	22,7	-	1,6	2,2	2,8	0,3	64,7	1,9	1,3

- Ausência

4. 2. 7 Atividade antioxidante *in vitro*

Como é sabido, os agentes antioxidantes são de extrema importância porque captam radicais livres e previnem a oxidação celular (Cook & Semman, 1996). São importantes na saúde humana, evitando doenças (Halliwell & Gutteridge, 1986) e na vida do homem em geral, por atuarem na conservação dos alimentos (Gomes, 2009).

Os fenóis, também são considerados como sendo de alta capacidade na retenção de radicais livres e, por estarem presentes no mel, mereceram análise (Ferreira *et al.*, 2009). Os resultados que se apresentam na Tabela XIII incluem, além dos fenóis totais, os resultados do DPPH e do poder redutor.

Tabela XIII – Valores de indicadores de atividade antioxidante de méis da Serra do Buçaco, fenóis totais, capacidade bloqueadora de radicais livres e poder redutor.

Amostras	Fenóis totais (mgGAEg⁻¹)	DPPH - EC50 (mgml⁻¹)	Poder Redutor (mgGAEg⁻¹)
Carreira	1,3	32,1	0,8
Botão	1,3	29,5	0,8
Sula	1,2	42,6	0,6
Telhado	1,1	43,5	0,7
Espinheira	1,3	34,8	0,7
Carvalho	1,8	30,8	1,0
Miro	1,4	31,1	0,8
Mata do Buçaco	1,2	33,9	0,7
Luso	1,4	26,6	0,7
L. de S. Pedro	1,6	23,8	0,9

4.2.7.1 Fenóis totais

A interpretação dos resultados deste parâmetro foi feita com base na estimativa quantitativa do teor de fenóis, como anteriormente descrito na metodologia. O ácido gálico foi utilizado como padrão de comparação, tendo sido construída a respetiva reta de calibração (Figura 16).

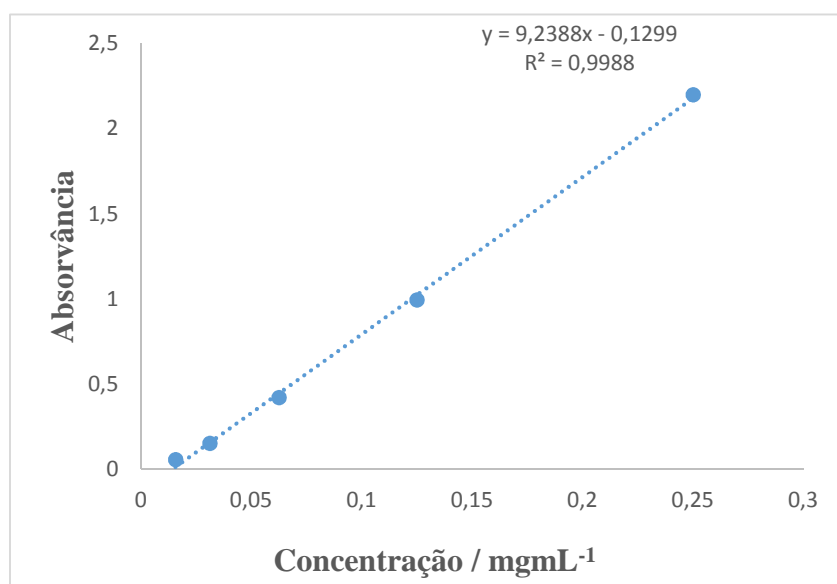


Figura 16 – Retra de calibração para o padrão ácido gálico.

Nos resultados obtidos para as 10 amostras de méis, verificam-se variações entre mínimos de 1,1 mgGAEg⁻¹, para o mel multifloral de *Eucalyptus* spp. e *Rhamnus alaternus* da região de Telhado, e um máximo de 1,8 mgGAEg⁻¹, para o mel multifloral de *Eucalyptus* spp., *Erica* spp. e *Rhamnus alaternus* da região de Carvalho (Figura 17).

O elevado teor de fenóis totais que se verifica no mel multifloral de Carvalho deve-se a forte contribuição de *Erica* spp., pois há uma concordância com estudos feitos por (Barbosa, 2012), em que os méis de urze apresentaram valores similares. Contudo, méis monoflorais de *Eucalyptus* spp., apresentaram valores também elevados e tudo indica que méis de urze e de *Eucalyptus* spp. apresentem valores elevados de fenóis totais. Algo importante a perceber neste conjunto de amostras é que todas tiveram maior representatividade de pólenes de *Eucalyptus* spp., daí um valor médio não inferior a 1,3 mgGAEg⁻¹ (Figura 17), o que é bastante bom quando se compara com os resultados do mesmo parâmetro obtidos por Barbosa (2012) para méis de laranja que estavam abaixo de 0,3 mgGAEg⁻¹. Assim, comparativamente aos méis Laranja e Urze, as 10 amostras analisadas têm um efeito antioxidante intermédio.

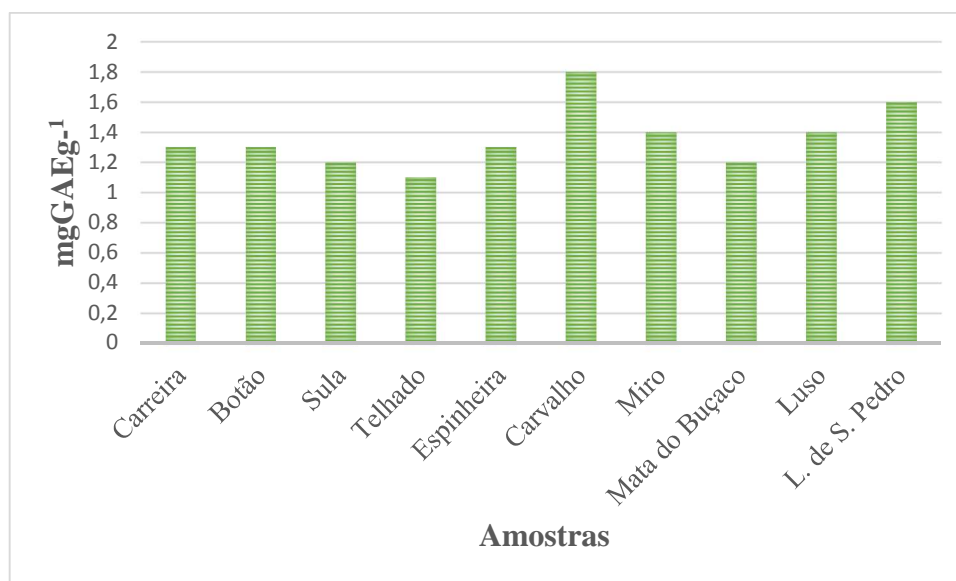


Figura 17 – Teor em fenóis totais nos méis da Mata do Buçaco.

4.2.7.2 Efeito bloqueador de radicais livres

A atividade bloqueadora de radicais livres, em conjunto com a análise de teor em fenóis totais, faz parte das metodologias que permitem avaliar a atividade antioxidante. Este parâmetro, neste trabalho, foi expresso em EC_{50} , que significa a capacidade das 10 amostras de mel em análise, bloquearem 50% dos radicais livres de DPPH submetidos no ensaio.

Segundo Serra (s.d.), quanto maior for o valor de EC_{50} , mais baixa será a capacidade das 10 amostras em inibir os tais radicais. Tal como esperado, durante esta análise ocorreu a redução da absorvância com a adição da amostra de mel, acompanhada por uma mudança da cor violeta do DPPH para amarelo (Alves *et al.*, 2013; Lopes, 2014).

Verificou-se uma elevada atividade antioxidante na amostra de Lameira de São Pedro, com EC_{50} de $23,8 \text{ mgml}^{-1}$, inversamente às amostras de Sula e Telhado, que tiveram valores de EC_{50} mais elevados, de $42,6 \text{ mgml}^{-1}$ e $43,5 \text{ mgml}^{-1}$, respetivamente, como se vê no gráfico da Figura 18.

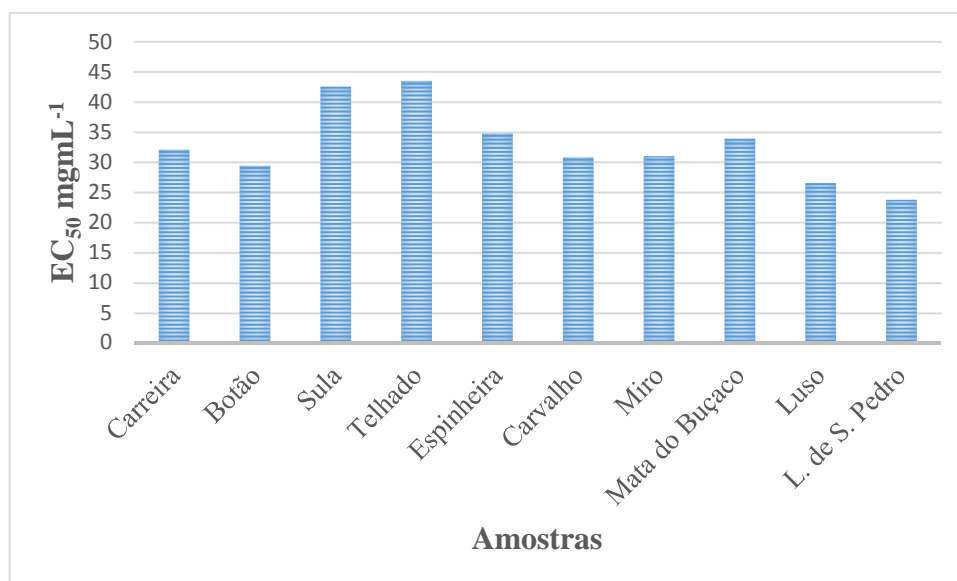


Figura 18 – Valores de EC₅₀ das amostras de méis da Serra do Buçaco.

Estes resultados foram, em geral, superiores aos reportados por Lopes para amostras da Guiné-Bissau, que variaram entre 10 mgmL⁻¹ e 25 mgmL⁻¹, com exceção da amostra de Gabú 02 que atingiu 61 mgmL⁻¹ (Lopes, 2014). No entanto, foram inferiores aos reportados para o nordeste de Portugal, onde dominaram valores entre 107 mgmL⁻¹ e 169 mgmL⁻¹ (Ferreira *et al.*, 2009). Isto mostra que, em termos qualitativos, os méis em estudo apresentam menor capacidade em sequestrar radicais livres que os da Guiné-Bissau mas, melhores comparativamente aos da região nordeste de Portugal. Estas diferenças são explicadas, provavelmente, por gradientes de temperaturas e pelas diferenças de origem botânica, pois, os méis em estudo são maioritariamente representados por grãos de pólen de *Eucalyptus* spp., *Rhamnus alaternus*, *Castanea sativa*, *Erica* spp., *Raphanus raphanistrum*, *Rubus ulmifolius* e *Tipo Cytisus*, enquanto, os méis da Guiné-Bissau, são representados maioritariamente por *Tipo Morus*, *Terminalia macroptera*, *Rhizophora* spp., *Crinum* spp., *Cassia sieberiana* e *Elaeis guineensis* (Lopes, 2014) e os da região nordeste de Portugal por *Rosmarinus officinalis*, *Echium vulgare* e *Erica australis* (Ferreira *et al.*, 2009).

Portanto, do ponto de vista geral, parece existir uma relação entre teor total de fenóis e o efeito bloqueador de radicais livres, de tal forma que a amostra de Lameira de São Pedro se tinha mostrado com elevado efeito antioxidante devido ao elevado teor de fenóis totais, mostra-se novamente como a amostra de maior poder antioxidante ao apresentar um valor de EC₅₀ mais baixo em relação às restantes amostras. Esta tendência verifica-se também em outras amostras.

4.2.7.3 Poder redutor

Para além dos indicadores de verificação dos efeitos antioxidantes anteriormente abordados, o poder redutor de um composto pode ser útil para o mesmo objetivo. Isto pode dar-se pela redução do complexo férrico que se desenvolve entre a tripiriltriazina e o ião Fe^{3+} , quando os antioxidantes estão presentes, verificando-se o surgimento de uma cor azul intensa (Lim & Lim, 2013; Gomathi *et al.*, 2014).

No gráfico que se segue (v. Figura 19), estão os resultados que mostram a variação do poder redutor nas diferentes amostras estudadas.

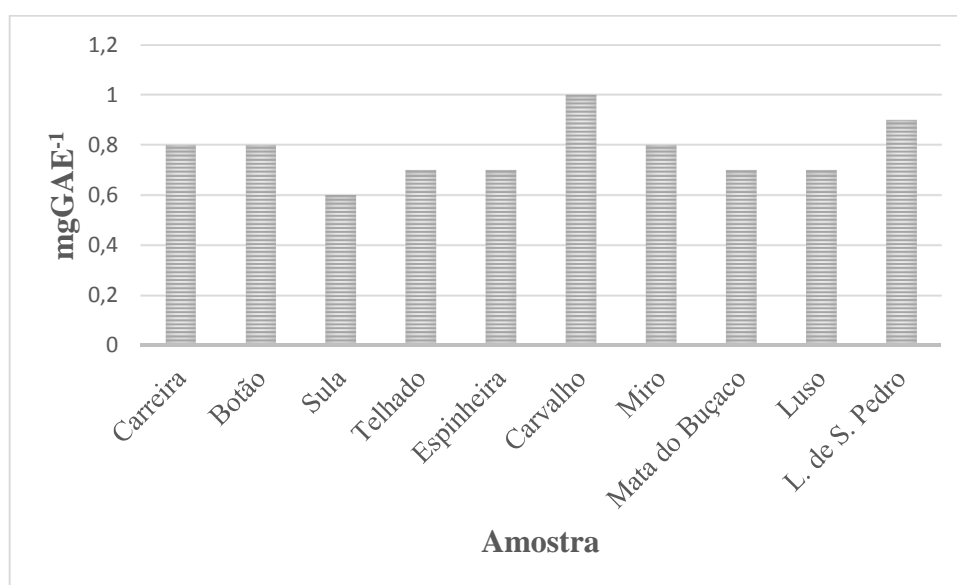


Figura 19 – Potencial redutor das amostras de mel da Serra do Buçaco.

A amostra de Carvalho, como aconteceu no parâmetro fenóis totais, é a amostra que apresenta um alto valor de potencial redutor, neste caso de $1,0 \text{ mgGAEg}^{-1}$. O valor mais baixo registou-se para a amostra de Sula, com $0,6 \text{ mgGAEg}^{-1}$, havendo uma tendência de comportamento semelhante entre este parâmetro e o de fenóis totais e ligeira diferença com o DPPH.

Portanto, os fatores que afetam o DPPH e o poder redutor são diferentes e tornam estas duas metodologias complementares na avaliação da atividade antioxidante *in vitro* (Lopes, 2014). Contudo, a amostra de Lameira de São Pedro continua a ter um comportamento persistente no que se refere a sua atividade antioxidante, tendo um valor de poder redutor também alto, de $0,9 \text{ mgGAEg}^{-1}$. Quer a amostra de Carvalho assim como a de Lameira de São Pedro, são as que também tiveram um alto valor de condutividade

elétrica e isto mostra o quanto a quantidade de fenóis totais e o poder redutor estão diretamente correlacionados.

4.3 Comparação dos parâmetros físico-químicos entre os méis monoflorais e multiflorais

A tabela XIV apresenta a caracterização do mel da Serra do Buçaco de acordo com os seus parâmetros físico-químicos e são apresentados os resultados do teste *t-student* para amostras de méis monoflorais e multiflorais, como foi descrito na metodologia. Este teste foi efetuado separadamente para cada parâmetro, a fim de investigar a existência de diferenças médias entre os parâmetros físico-químicos e os tipos de méis.

Os resultados da tabela XIV, mostram que apenas dois parâmetros físico-químicos, o pH ($t=2.314$, $p<0.05$) e a maltulose ($t=2.380$, $p<0.05$) diferiram significativamente quando se comparou os tipos de méis (monofloral de *Eucalyptus* versus multifloral de *Eucalyptus* e outros grupos taxonómicos). Os restantes parâmetros não diferiram significativamente em relação aos tipos de méis.

Estas diferenças podem ser explicadas devido a variação de origem botânica, visto que, segundo Pérez, (2003), os tipos de néctares influenciam consideravelmente os teores em açúcares e o valor de pH do mel resultante. Além disso, Silva *et al*, (2009), em um estudo feito na região do Luso, encontraram diferenças de pH entre amostras de méis multiflorais de *Erica* com *Rubus* e *Castanea*, *Eucalyptus* com *Erica* e *Rhamnus* e *Eucalyptus* com *Erica* e *Rubus* que, respetivamente, também variaram na ordem de 3,88, 3,60 e 3,94, comparativamente às amostras monoflorais de *Eucalyptus* que estavam na ordem dos 3,54, *Erica*, 4,26 e *Cytisus scoparius* com 3,91.

Tabela XIV – Diferenças estatísticas de Parâmetros físico-químicos entre as amostras monoflorais e multiflorais de méis da Serra do Buçaco.

Parâmetros	Tipos de méis		<i>t</i>	<i>T</i>	<i>P-value</i>
	Monofloral de <i>Eucalyptus</i>	Multifloral de <i>Eucalyptus</i> com outros grupos taxonômicos ¹			
Cor (mmPfund)	119,5±32,1	112,8±41,6	-0,287		0,782
C. Elétrica (µScm ⁻¹)	548,9±31,9	656,2±121,2	1,915		0,092
pH	3,8±0,2	3,9±0,1	2,314		0,049*
Prolina (mgg ⁻¹)	0,6±0,3	0,7±0,2	1,192		0,267
Frutose(%)	41,3±2,8	40,4±1,8	-0,562		0,589
Glucose(%)	22,8±1,2	22,6±0,8	-0,261		0,801
Turanose(%)	1,4±0,2	1,7±0,3		360	0,095
Maltulose(%)	1,1±0,3	1,6±0,4	2,380		0,045*
Maltose(%)	2,5±0,8	2,9±0,6	0,978		0,357
Trealose(%)	0,3±0,0	0,3±0,0	2,158		0,063
Fru+Glu(%)	64,1±2,8	63,1±2,0	-0,658		0,529
Fru/Glu(%)	1,8±0,2	1,8±0,1	-0,310		0,765
Índice diastásico (DN)	13,1±2,1	10,2±2,3	2,107		0,068
Fenóis totais (mgGAEg ⁻¹)	1,3±0,1	1,4±0,3		32,0	0,421
DPPH-EC50 (mgml ⁻¹)	34,4±5,1	31,4±7,6	-0,743		0,479
Poder redutor (mgGAEg ⁻¹)	0,7±0,1	0,8±0,1	1,489		0,175

Média ± D. Padrão; Não significante $P > 0.05$; Significante; * $P < 0,05$; ¹ Outras espécies, consultar tabela V.

4.3.1. Agrupamentos das amostras de acordo com a semelhança físico-química.

A Figura 20 ilustra o dendrograma dos tipos de méis em relação aos parâmetros físico-químicos o qual por consequência, acaba interpretando a relação de semelhança dos méis segundo a sua zona geográfica.

A análise de agrupamento dos parâmetros físico-químicos, como foi dito na metodologia, foi usada para descrever as relações entre as amostras do mel. Neste estudo, a matriz de distância Euclideana foi usada como uma matriz de similaridades (v. Figura 20). Os parâmetros humidade, HMF, a acidez livre, lactónica e total por não estarem

diretamente relacionados com a origem botânica, foram excluídos de modo a não interferirem na comparação com os dados das percentagens polínicas.

Atendendo que os valores das percentagens mínimas, a usar para se inferir a origem botânica, dependem de região para região (Pires *et al.*, 2005), achamos pertinente comparar cada agrupamento formado no dendograma com as percentagens de pólen de *Eucalyptus*, já que este dominou em todas as amostras, a fim de verificar se quase todas as amostras de um dado grupo apresentam valores superiores deste pólen e propor o valor mínimo como necessário para ser monofloral desta espécie para região da Serra do Buçaco. Foram encontrados dois grupos principais, a um corte da distância no nível 7 do dendograma (v. Figura 20).

O primeiro grupo é constituído por quatro amostras que, do ponto de vista botânico, são méis multiflorias (Luso com apenas 41% de *Eucalyptus*, Carreira 50,9%, Lameira de São Pedro 27,9% e Carvalho com 52,1%). Respeitando a ordem anterior, estavam presentes, em comum, outros grupos taxonómicos tais como: 4,9%, 15,9%, 4,2% e 5,1% de *Erica* spp., 1,5%, 0,0% 1,8% e 1,1% de *Aesculus hippocastanum*, 4,7%, 0,0%, 4,4% e 9,9% de *Rubus ulmifolius*, 5,7%, 2,2%, 1,1% e 0,0% de *Prunus* spp. 3,7%, 4,0%, 3,3% e 2,5% de *Raphanus raphanistrum* e 10,2%, 8,3%, 6,9% e 7,0% de outros tipos cumulativos polínicos, cuja percentagem individual não superou 1%. Os valores das percentagens polínicas, podem ser vistos na tabela V.

O segundo grupo é constituído por seis amostras (v. Figura 20), das quais cinco com percentagem de pólen de *Eucalyptus*, acima dos 70% (Mata do Buçaco 87,6, Botão 84,1, Miro com 70,7, Sula 87,8% e Espinheira 73,5%) e uma (Telhado) com 46,5% desta espécie. Considerando que esta espécie é sobre-representada, exigem-se valores elevados para a definição dos méis que a incluem como sendo monoflorais (Louveaux *et al.*, 1978), daí termos identificado apenas cinco destas amostras como monoflorais de *Eucalyptus*.

Contudo, apesar de Telhado ser um mel multifloral, apresenta em comum proporções similares (1,2%) de *Castanea sativa* com três das quatro amostras de méis monoflorais aqui identificados, nomeadamente, Sula (5,3%), Espinheira (5,8%) e Miro com 1,5%. Daí a similaridade verificada, mesmo com diferença considerável em termos da percentagem de *Eucalyptus*, visto que a *Castanea sativa*, segundo Louveaux *et al.* (1978), por ser uma planta com polen sobre-representado, tem a tendência de dominar em relação as plantas normais.

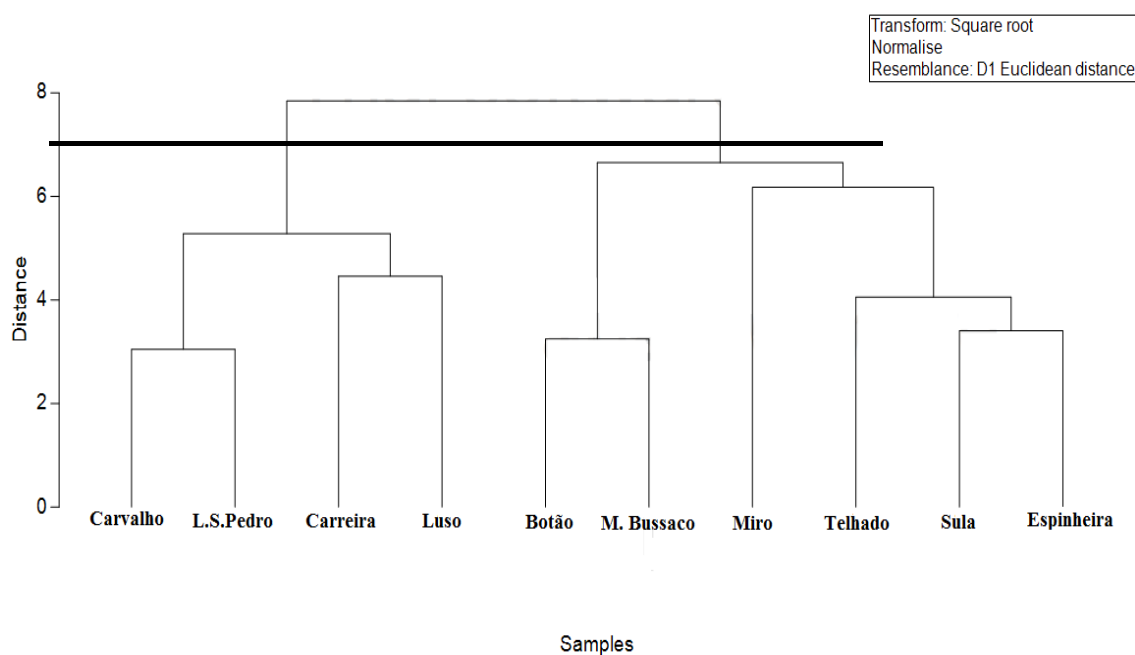


Figura 20 – Dendrograma da similaridade dos méis das regiões da Serra do Buçaco de acordo com as propriedades físico-químicas, pelo método de ligação completa.

— Nivel de corte.

A origem do escalonamento hierárquico de amostras de méis é bastante influenciada pela dominância de néctar de *Eucalyptus*. A forte influência da mesma, sobre a fraca e diferenciada partilha de néctar de outros grupos taxonómicos nessas amostras, definiu a formação dos dois grupos. Por causa disto, a influência dos parâmetros físico-químicos do néctar das espécies menos representadas, fez-se sentir em níveis mais baixos do escalonamento. Mais adiante, iremos mostrar com mais detalhes, através da análise de componentes principais como estes parâmetros se comportaram em relação à origem botânica.

A forte presença de *Eucalyptus* nas amostras de méis da Serra do Buçaco coincide com estudo realizado na região do Luso (Silva *et al.*, 2009) e pode ser explicada pela forte atividade silvícola. Segundo Matos (2011) cerca de 29% de porção total de terra na serra é ocupada pela agricultura e desses, 62% corresponde a plantação de monoculturas, onde cerca de 40% é predominada pela monocultura de *Eucalyptus* destinada a produção de papel.

Portanto, vários estudos mostram que o eucalipto é uma das espécies mais preferidas pelas abelhas para a produção de mel e este aspeto também é constatado neste estudo.

4.3.2. Contribuição dos parâmetros físico-químicos, vs espécies vegetais, na variação dos tipos de méis.

O objetivo da Análise de Componentes Principais (ACP) aqui utilizada foi encontrar os fatores físico-químicos que fortemente condicionaram a formação dos agrupamentos no dendrograma anterior e os grupos taxonómicos associados, visto que o dendrograma, segundo Vicini & Souza (2005), não faz a identificação das variáveis dependentes e independentes, isto é, não indica com clareza as medidas das variáveis do tipo causa e efeito.

A ACP foi realizada com as 10 amostras e 15 variáveis físico-químicas que, de acordo com a bibliografia, são aquelas que estão diretamente ligadas à origem floral.

Também se fez outra ACP com 22 variáveis palinológicas, correspondentes aos grupos botânicos envolvidos na formação das amostras destes méis.

Para as variáveis físico-químicas, a combinação dos eixos 1 e 3 (v. Figura 21) foi a que melhor mostrou as medidas da similaridade dos grupos conjugada com uma melhor correlação com o dendrograma da Figura 20. Estes eixos explicam melhor o agrupamento do dendrograma da figura 20 enquanto os eixos 1 e 2 da componente melissopalínológica (v. Figura 22), são os que melhor explicam as espécies botânicas associadas aos agrupamentos.

Os primeiros três eixos (v. Tabela XV) das variáveis físico-químicas representam 77,4% da variação total. O primeiro componente explica 37,5 % de variação total e tem uma alta carga positiva para as variáveis (parâmetros físicoquímicos) condutividade elétrica, fenóis totais, poder reductor, índice diastásico e maltulose que se contrastam com a carga negativa para o DPPH, frutose+glucose, glucose e a frutose (v. figura 21). O segundo componente explica 24,7 de variação total enquanto o terceiro explica 15,2% cujos valores das variáveis podem ser vistos na tabela do anexo II.

Tabela XV– Resultados da ACP realizada com 16 variáveis físico-químicas e 10 amostras de mel. Valores próprios, percentagem da variância explicada por cada eixo e percentagem de variância cumulativa explicada para os três eixos.

Eixos	Valores próprios	% da variância Explicada	% cumulativa var. explicada
1	5,9	37,5	37,5
2	3,9	24,7	62,2
3	2,4	15,2	77,4

Na componente melissopalínológica, os três eixos representam 72,6% da variação total. O primeiro componente explica 35,5% de variação total e tem uma carga positiva alta para as variáveis (espécies) *Genista* sp., *Pterospartum tridentatum* e Tipo *Cytisus*, respetivamente, que contrastam com a carga fortemente negativa para as espécies *Rubus ulmifolius*, *Aesculus hippocastanum*, *Lithrum* spp., e *Oenanthe crocata*. Como o pólen de eucalipto dominou em todas as amostras, a sua contribuição para a dissimilaridade nas mesmas não se fez sentir neste eixo. O segundo componente explica 21,8% da variação total e tem uma carga positiva alta para as espécies *Rhamnus alaternus*, tipo A19 e *Malus* spp., que contrasta com a carga fortemente negativa para as espécies *Eucalyptus globulus* e *Sedum* spp. O terceiro componente explica apenas 15,3%. (v. Tabela XVI). Os valores das variáveis, e as suas contribuições em cada eixo, podem ser vistos na tabela do anexo III.

Tabela XVI – Resultados da ACP realizada com 22 tipos polínicos e 10 amostras de mel. Valores próprios, percentagem da variância explicada por cada eixo e percentagem de variância cumulativa explicada para os três eixos.

Eixos	Valores próprios	% da variância Explicada	% cumulativa var. Explicada
1	7,5	35,5	35,5
2	4,5	21,7	57,3
3	3,2	15,3	72,5

Comparando o gráfico da ACP realizada com os dados físico-químicos (v. Figura 21) com o dendrograma da Figura 20, precebe-se que o grupo multifloral composto pelas amostras de méis de Carvalho, Lameira de São Pedro, Carreira e Luso, apresentaram

maior similaridades devido ao maior peso dado pela condutividade elétrica, fenois totais, poder reductor, maltulose, índice diastásico e pH, em contraste com os teores baixos de DPPH (que se traduz na maior capacidade bloqueadora de radicais livres), frutose, frutose+glucose e Glucose, alcançados em comum por estas amostras de mel. Os valores destes parâmetros podem ser vistos na Tabela do anexo IV.

Em relação ao grupo monofloral composto por amostras de méis da Mata do Buçaco, Botão, Miro, Sula e Espinheira, os eixos 1 e 3 da ACP, justificam esta similaridade devido ao maior peso de DPPH (que se traduz na menor capacidade bloqueadora de radicais livres), teores de frutose+glucose, frutose e glucose. Neste grupo, a amostra de Miro, devido ao elevado valor da razão entre Frutose/Glucose, comparativamente aos restantes elementos do grupo, mostra-se um pouco deslocada. A amostra de Telhado acaba tendo afinidade com este grupo monofloral devido a valores similares de DPPH e frutose+glucose que as restantes amostras multiflorais não tiveram. Os valores destes parâmetros podem ser vistos na Tabela IV do anexo três.

Em relação à componente melissopalínológica, (v. Figura 22), verificamos que o grupo de amostras monoflorais de eucalipto, com representação polínica acima dos 70%, surge de facto agrupada nesta ACP. Contudo, a amostra de Telhado, que surge no dendrograma junto com estas amostras, já surge nesta ACP afastada, por ser multifloral. A sua similaridade com o grupo monofloral que se verifica no dendrograma, poderá estar relacionada com a partilha com as amostras monoflorais de alguns tipos polínicos. Por exemplo, a amostra de Telhado, comparativamente à de Miro, apresenta 4,4 vs 8,2% de néctar de *Raphanus raphanistrum*, 5,9 vs 6,5% de Tipo *Cytisus*, 1,8 vs 2,2% de *Pterospartum tridentatum* e 1,8 vs 1,2% de *Genista* sp, respetivamente. O eixo 1 da ACP (v. Figura 22) que detêm 35,5% de variância total, explica esta afinidade.

No grupo multifloral, para além de terem menor percentagem de *Eucalyptus* relativamente às amostras monoflorais (v. Figura 22), mostram uma predominância de pólen de *Erica* spp., com cerca de 15,9% de néctar na amostra de mel de Carvalho, 5,1% em Lameira de São Pedro, 4,9% em Carreira e 4,2 em Luso. Ainda neste grupo, as amostras de Carreira, Luso e Lameira de São Pedro, partilharam juntos 1,5, 1,8 e 1,1% de néctar de *Aesculus hippocastanum* e 4,7, 4,4 e 9,9% de *Rubus ulmifolius*. Carreira e Lameira de São Pedro partilharam, em especial, 1,4 e 2,4% de *Lythrum* sp. e 2,2 e 3,4% de *Oenanthe crocata*.

Correlacionando as variáveis físico-química e as palinológicas, chega-se à conclusão que (i) elevados valores de condutividade elétrica, fenois totais, poder reductor, maltulose, índice diastásico e pH e teores baixos de DPPH, frutose, frutose+glucose e Glucose, registados nas amostras de multiflorais de Carvalho, Lameira de São Pedro, Carreira e Luso, parecem resultar da presença de grupos botânicos tais como o eucalipto (embora em menor percentagem do que nas amostras monoflorais), juntamente com *Erica* spp., *Aesculus hippocastanum*, *Rubus ulmifolius*, *Lythrum* sp. e *Oenanthe crocata*. (ii) elevados níveis de DPPH, teores de frutose+glucose, frutose e glucose, registados nas amostras monoflorais de Mata do Buçaco, Botão, Miro, Sula e Espinheira terão resultado, essencialmente, da elevada percentagem de néctar de eucalipto.

5. CONCLUSÕES

A caracterização biológica e físico-química das amostras de méis da Serra do Buçaco permitiu concluir que, no conjunto dos parâmetros analisados, nem todas as amostras de méis são de origem multifloral, ao contrário do apresentado nos rótulos das embalagens usadas pelos apicultores da Associação dos Apicultores do Litoral Centro.

Do ponto de vista quantitativo, na Serra do Buçaco, as regiões de Carreira, Botão, Sula, Telhado e Espinheira, produziram, na cresta de julho, mistura de méis de néctar e melada, enquanto Carvalho, Miro, Mata do Buçaco, Luso e Lameira de São Pedro produziram méis de néctar.

Do ponto de vista qualitativo na mesma serra, nas regiões de Mata do Buçaco, Botão, Miro, Sula e Espinheira, produziram méis monoflorais de eucalipto enquanto as regiões de Carvalho, Lameira de São Pedro, Carreira, Luso e telhado produziram méis multiflorais de eucalipto com outros grupos taxonómicos.

Dos 99 *taxa* encontrados, o pólen de *Eucalyptus* spp. é o que mais predomina nos méis da Serra do Buçaco. Para além deste, sobretudo nas amostras multiflorais, dominaram grãos de pólen de *Rhamnus alaternus*, *Castanea sativa*, Tipo *Cytisus*, *Echium* spp., *Erica* spp., *Aesculus hippocastanum*, *Rubus ulmifolius*, *Prunus* spp. e *Raphanus raphanistrum*

Há fortes indícios de que na Serra do Buçaco, apesar do eucalipto não ser considerada uma planta invasora² mas sim exótica, é a espécie que mais presença e influência tem nos processos ecológicos apícolas no primeiro semestre do ano. Portanto, do ponto de vista melífero, o eucalipto é a espécie mais frequente na serra e mais dominante.

A *Raphanus raphanistrum* é a segunda espécie mais frequente ao longo da Serra mas, em geral, não domina sobre a *Castanea sativa*. De facto, aparece em 9 das 10 áreas amostradas com frequências polínica entre 1,3 a 8,2%, enquanto a *C. sativa* aparece em 6 das amostras, mas chega a atingir os 35,8%. A *Castanea sativa* é a terceira espécie mais frequente e a segunda mais dominante.

² Já começa a mostrar o seu carácter invasor visto que, se até alguns anos a extensão ocupada pelo eucalipto em Portugal, apesar de muito elevada, estava diretamente ligada a atividade humana e sem revelar o carácter invasor, nos últimos anos, começou a observar-se a colonização de locais por plântulas de eucalipto, oriundas da germinação de sementes, para além dos limites das plantações (Silva *et al.*, 2007).

Os resultados da condutividade elétrica e da percentagem de frutose+glucose permitiram, também, concluir que cinco das dez amostras analisadas se tratam de méis de néctar, enquanto as restantes cinco são de mistura de néctar com melada. Em relação ao processo de cristalização, verifica-se no geral uma dinâmica lenta que culmina com a cristalização parcial.

A cor do mel da Serra do Buçaco enquadra-se na classe dos méis mais escuros da escala Pfund, que inclui os méis âmbar claro âmbar e âmbar escuro.

Em relação à qualidade destes méis, os valores da humidade, acidez e pH, índice diastásico, HMF, prolina e a ausência de sacarose, por estarem em conformidade com os valores padronizados pela legislação internacional, permitem concluir que são méis de boa qualidade, frescos e sem adulteração.

Os resultados dos efeitos bioativos encontrados nestes méis permitem concluir que estas amostras não apresentam um efeito antioxidante elevado mas reúnem uma capacidade moderada, maior que os méis de laranjeira e menor que méis de urze.

Este trabalho permitiu confirmar que o pH e teor em maltulose dependem da origem botânica dos méis. Embora os outros açúcares, bem como a condutividade elétrica, a cor, teor em prolina, índice diastásico, fenois totais, poder reductor e a capacidade que uma amostra de mel tem em bloquear radicais livres, não diferirem significativamente, dependem também da presença estocástica dos diferentes grupos botânicos, quer em méis monoflorais, quer em multiflorais.

As similaridades físico-químicas, que por vezes surgem entre méis monoflorais de uma dada espécie versus multiflorais, podem resultar da presença, mesmo em baixas percentagens, de certos grupos taxonómicos similares.

Seria positivo expandir o presente estudo com a análise de mais amostras da região, de forma a permitir confirmar os resultados obtidos, tais como: a percentagem mínima de pólen de eucalipto que se definiu para considerar as amostras como monoflorais desta espécie; as variáveis físico-químicas em que as amostras monoflorais diferiram significativamente das multiflorais e a inesperada ausência de pólen de espécies exóticas, sobretudo na amostra da Mata do Buçaco.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Torres, S. R., Cavia, M. M., Fernandes-Muiño, M. A., Moreno, G., Hudobro, J., & Sancho, M. T. (2006). Evolution of acid phosphatase activity of honey from different climates. *Food chemistry*, *97*, 750–755.
- Alves, A., Ramos, A., Gonçalves, M., Bernardo, M., & Mendes, B. (2013). Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. *Journal of food composition and analysis*, *30*(2), 130–138.
- Anklam, E. (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food chemistry*, *63*(4), 549–562.
- ANF-Autoridade Florestal Nacional. (2009). *Plano de ordenamento e gestão da mata nacional do Buçaco*. Lisboa. 283p.
- Avallone, C. M., Montenegro, S., Chifa, C., & Andrés, A. (s.d) *Control de Calidad de las Mielles de la Provincia del Chaco–Argentina y Mapa Apícola*. UNNE - Faculdade de Agroindustria. Em "Galeria apícola Virtual" Retirado em 11.03.2015 de (http://www.beekeeping.com/articulos/mielles_chaco.htm).
- Bagnato, V. S., & Rodrigues, V. (2006). Mechanical model for the electro-conductivity in metals: temperature effects, *Revista brasileira de ensino de física*, *28*, 35–39.
- Ball, D. W. (2007). The Chemical Composition of Honey. *Journal of chemical Education*, *84*, 1643-1646.
- Barbosa, M. (2012). *Avaliação da estabilidade de mel da mesma origem ao longo de 6 anos: comparação com mel comercializado*. [Dissertação de mestrado]. Universidade de Porto. Porto. 99p.
- Barth, M. (2005). Botanical resources used by *Apis mellifera* determined by pollen analysis of royal jelly in Minas Gerais, Brazil. *Journal of apicultural research*, *44*(2), 78–81.
- Belay, A., Solomon, W. K., Bultossa, G., Adgaba, N., & Melaku, S. (2013). Physicochemical properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Food chemistry*, *141*(4), 3386–3392.
- 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*(3), 1157–1165.
- Bogdanov, S. (2002). Harmonised methods of the international honey commission. *Swiss bee research centre* *5*, 1–62.
- Bonvehi, J. S. 1989. Estudio de la validez de los indices que predicen la cristalización de la miel. *Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, *29* (1), 47-62. *In*

- Bhandari, B. D'Arcy, B. & Kelly, C. (1999). Rheology and crystallization kinetics of honey: present status. *International Journal of Food Properties*, 2(3), 217-226.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food science and technology*, 28, 25–30.
- Bryant, V. M., & Jones, G. D. (2001). The r-values of honey: Pollen coefficients. *Palynology*, 25(1), 11–28.
- Campos, M.G.G. (1988). *Contribuição para o estudo do pólen, geleia real e propólis*. Faculdade de farmácia. Universidade de coimbra, 19p.
- Carretero, J. L. (1989) *Analisis polinico de la Miel*. S.A. Mundi-Prensa. Madrid, 120p
- Cook, N.C. & Samman, S. (1996). Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional biochemistry*, 7, 66 -76.
- DL. - Decreto-Lei n.º 126/2015 - Diário da República n.º 130/2015, Série I de 2015-07-07, 4676 - 4678.
- Diretiva 2001/110/CE. (2001). Critérios de composição dos méis. *Jornal oficial das comunidades europeias*, 10, 47–52.
- 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(2), 347–354.
- Erdtman, G. (1971). *Pollen morphology and plant taxonomy*. Hafner publishing company. New York. 13p.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. (2012b). Honey: a novel antioxidant. *Molecules*, 17(4), 4400–4423.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Wahab, M. S. A. (2012a). Oligosaccharides might contribute to the antidiabetic effect of honey: a review of the literature. *Molecules*, 17(1), 248–266.
- Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a european atlantic area. *Food chemistry*, 138(2), 851–856.
- Estevinho, L., Feas, X., Seijas, J., & Vasquez-Tato, M. (2012). Organic honey from Trás-os-montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and chemical toxicology*, 50, 258–264.
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., & Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of northeast portuguese propolis: Usual and unusual compounds. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(2), 887–897.

- Feás, X., Pires, J., Estevinho, L., Iglesias, A., & Araujo, P. (2010). Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. *International journal of food science and technology*, 45(6), 1255–1262.
- Ferreira, C. M. (2008). *Caracterização de méis da Serra do Caramulo*. [Dissertação de mestrado]. Universidade de Aveiro. Aveiro. 133p.
- Ferreira, I., Aires, E., Barreira, J., & Estevinho, L. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food chemistry*, 114(4), 1438–1443.
- Finco, F., Moura, L., & Silva, I. (2010). Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L.. *Ciencia e tecnologia de alimentos*, 14, 706–712.
- FMB-Fundação Mata do Buçaco (2012) *Projeto BRIGHT- Buçaco Recovery from invasions generating Habitat Threats*. Retirado em 13/01/2016 de <http://www.fmb.pt/bright/index.php/pt/>.
- Gardana, C., Scaglianti., Pietta., P., Simonetti., P. (2007). Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 45, 390–399.
- Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Vidya, B., & Uma, C. (2015). In vitro free radical scavenging activity of ethanolic extract of the whole plant of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. *Chinese Journal of integrative medicine*, 21(6), 453-458.
- Gomes, S. (2009). *Caracterização e avaliação biológica de méis comerciais*. [Dissertação de mestrado]. Escola superior agrícola, Instituto politécnico de Bragança. Bragança. 67p.
- Gomes, T., Feás, X., Iglesias, A., & Estevinho, L. (2011). Study of organic honey from the northeast of Portugal. *Molecules*, 16(7), 5374–5386.
- González-Miret, L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M., & Heredia, F. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 2574–2580.
- Gutiérrez, B. P., & García, D. L. Q. (2007). Estudio melisopalínológico de dos mieles de la porción sur del valle de México. *Polibotánica*, 23, 57–75.
- Hagler, J. R., Mueller, S., Teuber, L. R., Machtley, S. A., & Deynze, A. V. (2011). Foraging range of honey bees, *Apis mellifera*, in alfalfa seed production fields. *Journal of insect science*, 11, 1-12.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 246(2), 501-514.

- Huidobro, J. F., & Simal, J. (1985). Parametros de calidad de la miel VIII: comentario a los resultados encontrados en muestras comerciales. *Offarm*, 4(2), 69-73.
- Iglesias, A., Feás, X., Rodrigues, S., Seijas, J., Vázquez-Tato, M., Dias, L., & Estevinho, L. (2012). Comprehensive study of honey with protected denomination of origin and contribution to the enhancement of legal specifications. *Molecules*, 17(7), 8561–8577.
- IHC-International Honey Commission. (2009). *Harmonised methods of the international honey commission*. (Retirado em 10/08/2015, de <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm>).
- Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2010). High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and chemical toxicology*, 48(8), 2388–2392.
- Lim, C. S. H., & Lim, S. L. (2013). Ferric reducing capacity versus ferric reducing antioxidant power for measuring total antioxidant capacity. *Laboratory medicine*, 44(1), 51–55.
- Lopes, M. (2014). *Qualidade dos Produtos apícolas da Guiné Bissau: Mel e própolis*. [Dissertação de mestrado]. Instituto Politécnico de Bragança. Bragança. 91p.
- Lopes, L. G. M. P. (2012). *Flora e Vegetação da mata climácica do Buçaco*. [Dissertação de mestrado]. Universidade de Aveiro. Aveiro. 153p.
- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee world*, 51(3) 125 -138.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, 613(1), 1–19.
- Maia, M., Almeida, R., & Pereira, O. (2002). Pollen spectra of honeys from the archaeological park of the Vale do Coa (Portugal). *Revista portuguesa de zootecnia*, IX(1), 79–91.
- Malheiro, R., Oliveira, I., Vilas-Boas, M., Falcão, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2009). Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food and chemical toxicology*, 47, 92–97.
- Malika, N., Mohamed, F., & Chakib, E. (2005). Microbiological and physico-chemical properties of Moroccan honey. *International journal of agriculture & biology*, 1, 50, 773–776.
- Matos, M. M. A. D. S (2011). *Vertebrate diversity in the Buçaco Mountain and surrounding areas*. [Tese de doutoramento]. Universidade de Aveiro. Aveiro. 182p.

- Matos, M., Soares, A., Morgado, F., & Fonseca, C. (2007). Mastofauna del bosque nacional de Buçaco, Centro de Portugal. *Galemys: Boletín informativo de la sociedad española para la conservación y estudio de los mamíferos*, 19(1), 45–59.
- Modro, A. F. H., Message, D., Luz, C. F. P. D., & Meira Neto, J. A. A. (2011). Flora de importância polinífera para *Apis mellifera* (L.) na região de Viçosa, MG. *Revista árvore*, 35(5), 1145–1153.
- Morais, P. J. S. (2002). *Plano tipo de utilização do perímetro florestal da serra do Buçaco*. Direcção regional de agricultura da Beira Litoral. Coimbra.
- Negueruela, A., I. & Perez-Arquillue, C. (2000). Color measurement of Rosemary honey in the solid state by reflectance spectroscopy with black background. *Journal of AOAC International*, 83(3), 669-674.
- Oddo, P., Baldi, E., & Accorti, M. (1990). Diastatic activity in some unifloral honeys. *Apidologie*, 21(1), 17–24.
- Ohe, V., Oddo, L., Piana, M., Monique, M., & Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, S18–S25.
- Oroian, M., Amariei, S., Rosu, A., & Gutt, G. (2015). Classification of unifloral honeys using multivariate analysis. *Journal of essential oil research*, 27(6), 533–544.
- Padilla, C., Villalobos, P., Spiller, A., & Hanry, G. (2007). Implications for traditional food producers. *Agricultura técnica*, 67(3), 300-3008.
- Paiva, J. (2004). A relevante biodiversidade da mata. *Monumentos*, 20, 21-27.
- Paudyal, K. N., & Gautam, I. (2012). SEM investigation of pollen taxa in honey from autochtone *Apis cerana* in Godavari, Lalitpur distric, Nepal. *Journal Natural History Museum*. 26, 29-67.
- Pérez, R. G. (2003). *Estudio palinológico y colorimétrico de mieles monoflorales de la región de Murcia*. Proyecto fin de carrera. Universidade Politecnica de Cartagena. Cartagena. 232p.
- Perez-Aquillue, C., Conchello, P., Arino, A., Juan, T., & Herrera, A. (1994). Quality evaluation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. *Food Chemistry*, 51, 207–210.
- Perron, N., & Brumaghim, J. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell biochemistry and biophysics*, 53(2), 75–100.
- Pinho, R., Lopes, L. & Ezequiel, J. (2009). Listagens da Flora da Mata Nacional do Buçaco. In *Plano de ordenamento e gestão da mata nacional do Buçaco*. Ed. por Direcção regional de florestas do centro. Mealhada.

- Pires, A., Rodrigues, T., Rocha, a, Paugelo, a, & Pereira, O. (2004). Pollen spectra of honeys from Trás-Os-Montes e Alto Douro. *Revista portuguesa de zootecnia*, 87–99.
- Radich, M. C. (2007). Introdução e expansão do eucalipto em Portugal. In *Pinhais e eucaliptais. A floresta cultivada*. Ed. por Joaquim Sande Silva.. 151-165 pp. Público, comunicação social SA e fundação luso-americana para o desenvolvimento, Lisboa.
- Román, L., & Palma, J. (2007). Árboles y arbustos tropicales nativos productores de néctar y polen en el estado de Colima, México. *Avances en investigación agropecuaria*, 11(3), 3–24.
- Ruoff, K. (2006). Authentication of the botanical origin of honey by near-infrared spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6867–6872.
- Sajwani, A., Farooq, S. A., Patzelt., A., Eltayeb, E. A., & Bryant, V. M. (2007) Melissopalynological studies from Oman, *Palynology*, 31(1), 63–79.
- Sancho, M. T., Muniategui, S., Lopez, J., Simal, J., & Huidobro, J. F. (1990). Comparacion de los metodos de cromatografia liquida de alta resolucion y enzimatico para la determinacion de fructosa y glucosa en la miel y analisis rapido de otros azucares. *Anales de bromatologia*. XLII(1), 71–81.
- Santos, A. M. M. (1993). *Caracterização da mata nacional do Buçaco*. Ed. do autor. Anadia.146p.
- Santos, C. F. O. (1964). Avaliação do período de florescimento das plantas apícolas no ano de 1960, através do pólen contido nos méis e dos coletados pelas abelhas (*Apis mellifera* L.). *Anais da Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz*, 21, 253–264.
- Sanz, M., Gonzalez, M., De Lorenzo, C., Sanz, J., & Martinez-Castro, I. (2005). A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food chemistry*, 91(2), 313–317.
- Sequeira, A. J. D., & Medina, J. (2004). A mata e o seu enquadramento geológico. *Monumentos: Revista semestral de edifícios e monumentos*, 20, 29-35.
- Serra, M. C. D. C. (s.d.) *As propriedades antioxidantes do mel*. Centro de estudos de engenharia química: Instituto superior de engenharia de Lisboa. Retirado em 05/11/2015 de (<http://www.oapicultor.com/artigos/Propriedades%20Oxidante>).
- Silva, C., Queiroz, A., & Figueirêdo, R. (2004). Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. *Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental*, 8(2/3), 260–265.
- Silva, J. S., Sequeira, E., Catry, F & Aguiar, C. (2007). Os contras. In *Pinhais e eucaliptais. A floresta cultivada*. Ed. por Joaquim Sande Silva.. 221-259 pp. Público, comunicação social SA e fundação luso-americana para o desenvolvimento, Lisboa.

- Silva, L. R., Videira, R., Monteiro, A. P., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2009). Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical journal*, *93*(1), 73–77.
- Silvano, M., Varela, M., Palacio, M., Ruffinengo, S., & Yamul, D. (2014). Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. *Food Chemistry*, *152*, 500–507.
- Simões, P. F. P. F (2010). *A paisagem cultural do Buçaco. A singularidade de um território turístico e de lazer*. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de letras da Universidade de Coimbra. Coimbra. 105p.
- Soler, C., Gil, M., García-Viguera, C., & Tomás-Barberán, F. (1995). Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. *Apidologie*, *26*(1), 53–60.
- Sorkun, K & Dogan, C. (1995). Pollen analysis Rize-Anzer (Turkish) honey. *Hacettep University, faculty of science, Biology departament, Ankara*, 75-82.
- Steffan-Dewenter, I. & Tschardtke, T. (2000). Resource overlap and possible competition between honey bees and wild bees in central Europe. *Oecologia*, *122*, 288-296.
- Terraba, A., Díeza, M. J., Heredia, F. J. (2002) Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics, *Food chemistry*, *79*, 373–379.
- Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O. S., Tastemur, B., Sagdic, O., Kayacier, A. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial crops and products*, *46*, 124–131.
- Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., & Ré, E. (2008). Honey diastase activity modified by heating. *Food chemistry*, *106*(3), 883–887.
- Tosi, E., Ciappini, M., Re', E., Lucero, H. (2002). Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food chemistry* *77*, 71–74.
- Truzzi, C., Annibaldi, A., Illuminati, S., Finale, C., & Scarponi, G. (2014). Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food chemistry*, *150*, 477–481.
- Valencia, B. R. M., Fombella-Blanco, M. A., Gonzalez, D. F., & Diaz-Gozzalez, T.E., (2000). Pollen spectra of honey from different phytogeographical regions of the Leon province, NW Spain. *Grana* *33*, 268-275.
- Vicini, L., Souza, A. M. (2005). *Análise multivariada, da teoria à pratica*. [Dissertação de mestrado]. *Universidade Federal de Santa Maria*. Santa Maria, RS, Brasil. 215p.
- Wahdan, H. A. L. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*, *26*, 30-35.

- White, J. W. (1994). The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation: Quality Evaluation. *Bee world*, 75(3), 104 - 117.
- White, J. W., & Doner, L. (1980). Honey Composition and Properties. *Beekeeping in the United States (agriculture aandbook)*, (335), 82–91.
- White Jr, J. W., Riethof, L. M, Subers, M. H & Kushnir, I (1962). Composition of American honeys, *Technical bulletin* No. 1261, Washington, D.C. 133p.
- Williamson, M. P. (1997). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical journal*, 297, 249-260.
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., & Raymont, K.(2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *Food chemistry* 86, 169–177.
- Yuksel, Z., Avci, E., & Erdem, K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food chemistry*, 121(2), 450–456.
- Zandamela, M. E. M. F. (2008). *Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de mozambique*. [Tesis doctoral].Universidade autónoma de Barcelona. Ballatera, 241p.

Anexos

Anexo I – Teste de normalidade dos dados físico-químicos.

Parâmetros F.Q.	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
C	.232	10	.136	.849	10	.057
CE	.182	10	.200*	.945	10	.606
pH inicial	.184	10	.200*	.926	10	.412
I.D	.165	10	.200*	.903	10	.236
P	.144	10	.200*	.943	10	.588
F	.188	10	.200*	.957	10	.750
G	.153	10	.200*	.909	10	.275
T	.209	10	.200*	.889	10	.164
MI	.138	10	.200*	.975	10	.932
M	.152	10	.200*	.969	10	.880
Tr	.122	10	.200*	.960	10	.782
F+G	.119	10	.200*	.985	10	.987
F/G	.124	10	.200*	.968	10	.873
F.T.	.246	10	.088	.870	10	.101
D	.180	10	.200*	.929	10	.442
pR	.168	10	.200*	.948	10	.642

*. Limite inferior da significância real.

a. Correção de significância *Lilliefors*

DF – graus de liberdade

C – cor, ID – índice diastásico, CE – condutividade elétrica, P – prolina, F – frutose, G – glucose, T. – turanose, MI – maltulose, M – maltose, Tr – trealose, F+G – frutose mais glucose, F/G – frutose/glucose, FT – fenois totais, D – capacidade bloqueadora de radicais livres de DPPH, Pr – poder redutor.

Anexo II – Correlação entre as variáveis físico-químicas iniciais e as componentes principais.

Variáveis	PC 1	PC 2	PC 3
C	0.164	-0.909	-0.061
ID	0.782	0.008	-0.529
CE	0.932	-0.059	0.117
PH	0.702	0.404	0.537
P	0.706	0.110	-0.583
F	-0.344	-0.879	0.143
G	-0.371	0.234	-0.847
T	0.209	0.081	0.221
MI	0.781	-0.146	0.326
M	0.167	0.597	0.350
Tr	0.667	0.202	0.116
F+G	-0.487	-0.751	-0.217
F/G	-0.045	-0.807	0.564
FT	0.880	-0.297	-0.172
D	-0.679	0.389	0.267
pR	0.797	-0.493	-0.124

C – cor, ID – índice diastásico, CE – condutividade elétrica, P – prolina, F – frutose, G – glucose, T. – turanose, MI – maltulose, M – maltose, Tr – trealose, F+G – frutose mais glucose, F/G – razão frutose glucose, FT – fenois totais, D – capacidade bloqueadora de radicais livres de DPPH, Pr – poder redutor.

Anexo III – Correlação entre as variáveis melissopalínológicas iniciais e as componentes principais.

Variáveis	PC 1	PC 2	PC 3
Eg	0.317	-0.819	0.374
S	0.365	-0.441	-0.242
E	-0.487	0.299	-0.684
Er	-0.266	0.322	0.195
Ra	0.535	0.659	0.361
G	0.788	0.420	-0.210
Am	0.676	0.676	0.055
Pt	0.751	0.009	-0.258
Tr	-0.485	0.340	0.634
TC	0.706	0.331	-0.292
Ah	-0.719	0.368	-0.136
A19	0.677	0.629	-0.068
Ru	-0.768	0.387	-0.488
M	0.677	0.629	-0.068
P	-0.497	0.344	0.741
Cm	-0.476	0.379	0.587
Hh	0.565	0.608	0.155
Oc	-0.707	0.466	-0.287
Rr	0.400	0.162	-0.182
L	-0.717	0.479	-0.223
Cs	-0.498	0.113	-0.643
OT	-0.367	0.496	0.269

Eg – *Eucalyptus globulus*, S - *Sedum* spp., E – *Echium* spp., Er – *Erica* spp., Ra – *Ramnus alaternus*, G - *Genista* spp., Am – *Acacia melanoxylon*, Pt – *Pterospartum tridentatum*, Tr – *Trifolium repens*, TC – Tipo *Cytisus*, *Aesculus hippocastanum*, A 19 – Tipo A 19, Ru – *Rubus ulmifolius*, *Malus* spp, P – *Prunus* spp., Cm – *Crataegus monogyna*, Hh – *Hedera* spp. , Oc – *Oenanthe crocata*, Rr – Tipo *Raphanus raphanistrum*, L – *Lythrum* spp., Cs – *Castanea sativa*, OT – outros tipos

Anexo IV - Parâmetros físico-químicos medidos para cada amostra de mel da Serra do Buçaco (cresta de julho de 2014).

	Cor (Pfund)	ID (DN)	CE (μScm^{-1})	pH	P (mgg^{-1})	F (%)	G (%)	T (%)	MI (%)	M (%)	Tr (%)	F+G (%)	F/G (%)	FT (mgGAEg^{-1})	D (mgml^{-1})	Pr (mgGAEg^{-1})
M. Buçaco	150.0	8.7	506.0	3.6	0.3	44.9	22.9	1.5	1.2	1.3	0.3	67.8	2.0	1.2	33.9	0.7
Miro	106.3	14.2	534.3	3.6	1.0	39.2	24.9	1.1	0.7	2.2	0.3	64.1	1.6	1.4	31.1	0.8
Botão	150.0	8.7	579.0	3.8	0.4	43.7	22.0	1.3	1.0	2.5	0.3	65.7	2.0	1.3	29.5	0.8
Telhado	61.7	10.6	455.7	3.8	0.5	41.4	23.6	1.6	1.2	3.9	0.3	65.0	1.8	1.1	43.5	0.7
Sula	117.3	9.8	543.7	3.9	0.4	39.7	22.1	1.4	1.1	2.9	0.2	61.8	1.8	1.2	42.6	0.6
L. S. Pedro	150.0	15.1	708.7	3.9	1.0	42.0	22.7	1.6	2.2	2.8	0.3	64.7	1.9	1.6	23.8	0.9
Espinheira	74.0	9.7	581.7	3.9	0.7	38.8	22.1	1.5	1.5	3.5	0.3	61.0	1.8	1.3	34.8	0.7
Carreira	126.3	12.3	632.7	3.9	0.8	39.7	23.1	2.3	1.3	2.4	0.3	62.9	1.7	1.3	32.1	0.8
Carvalho	150.0	15.4	726.7	4.0	0.9	41.3	21.5	1.5	1.8	3.0	0.4	62.8	1.9	1.8	30.8	1.0
Luso	76.0	12.2	757.3	4.1	0.6	37.6	22.3	1.5	1.6	2.6	0.4	60.0	1.7	1.4	26.6	0.7

C – cor, ID – índice diastásico, CE – condutividade elétrica, P – prolina, F – frutose, G – Glucose, T. – turanose, MI – maltulose, M – maltose, Tr – trealose, F+G – Frutose mais glucose, F/G – razão frutose glucose, FT – fenois totais, D – capacidade bloqueadora de radicais livres de DPPH, Pr – poder redutor.