



RELATÓRIO ANUAL DE EXECUÇÃO DO PROJETO **Intervenção B.2.7 – Apoio a projetos de investigação aplicada**

Ano de execução: Agosto 2024 – Julho 2025

**Mel I.D. - Autenticação da origem botânica do mel: metodologias inovadoras
baseadas na análise de DNA do pólen e de compostos voláteis com vista à
caracterização e valorização de méis portugueses**

PROGRAMA APÍCOLA NACIONAL 2023-2027

1. Nota Introdutória

O projeto Mel I.D. (Autenticação da origem botânica do mel: metodologias inovadoras baseadas na análise de DNA do pólen e de compostos voláteis com vista à caracterização e valorização de méis portugueses) visa contribuir para a valorização e diferenciação dos méis portugueses, com particular enfoque nos méis monoflorais com vista a incrementar a sua promoção como produtos premium de elevada qualidade. Para tal, pretende-se desenvolver ferramentas inovadoras que permitam a autenticação de méis monoflorais e detetar fraudes devido a misturas com méis de outras proveniências, e desta forma sedimentar a confiança do consumidor no consumo de méis nacionais.

O mel é considerado um dos produtos animais mais propensos a ser adulterado. Tal inclui a comercialização de mel de menor valor rotulado como sendo de qualidade superior, nomeadamente como sendo monofloral ou DOP. Os méis monoflorais e multiflorais têm geralmente diferente valor comercial, sendo que os primeiros são frequentemente preferidos pelo consumidor, o que tende a conduzir ao aumento do seu valor comercial, e os torna alvos preferências de fraudes. Por este motivo, é de elevada importância o desenvolvimento de ferramentas/metodologias que permitam estabelecer de forma fiável a origem botânica do mel, com vista à deteção de fraudes. A deteção da “assinatura botânica” de um mel é comumente utilizada para avaliar a prevalência de pólen de diferentes espécies e confirmar tratar-se, ou não, de um mel monofloral e verificar a sua conformidade com a rotulagem. A melissopalínologia, uma técnica que avalia a origem botânica do mel através da avaliação dos seus grãos de pólen, é tradicionalmente usada para esta finalidade. A classificação de um mel como sendo monofloral é baseada na predominância de pólen de uma única origem botânica, a qual é geralmente fixada em 45% para a maioria dos méis monoflorais, havendo, contudo, exceções como no caso de espécies em que o pólen está sobrerrepresentado (ex. rosmaninho) ou em que a sua abundância é muito elevada (ex. castanheiro). Contudo, esta técnica apresenta algumas limitações, tais como depender de um conhecimento muito especializado por parte de quem faz a análise, a existência de palinotecas representativas, a morfologia dos grãos muito semelhante entre algumas espécies, e o facto de ser uma técnica muito laboriosa e demorada (Bruni et al., 2015). Desta forma, nos últimos anos têm sido realizados diversos trabalhos no sentido de propor alternativas à técnica de melissopalínologia que sejam mais precisas e rápidas. Neste sentido, o projeto Mel I.D. tem como objetivos específicos:

- Desenvolvimento de metodologias inovadoras e de elevado rendimento (DNA metabarcoding) para a identificação botânica de méis Portugueses;
- Caracterização do perfil de compostos voláteis de méis monoflorais Portugueses;
- Avaliação da potencialidade de usar um sensor de baixo custo para obter um “fingerprint” de méis monoflorais que possa ser usado como uma ferramenta rápida de screening de fraudes de origem botânica;
- Aplicação das metodologias desenvolvidas à análise de amostras comerciais no mercado nacional com vista à deteção de eventuais adulterações por misturas não declaradas com méis importados de menor valor comercial;

Para tal, foi estabelecido um cronograma, incluindo diferentes tarefas que serão realizadas no período compreendido entre Março 2023 e Julho 2027.

Assim, para a concretização destes objetivos, o projeto inclui quatro tarefas científicas, nomeadamente a Tarefa 1, que se prende com a amostragem e que está interligada com as Tarefas 2: Autenticação Botânica – metodologia de DNA metabarcoding, Tarefa 3: Autenticação botânica – compostos

voláteis (GC-MS) e tarefa 4: Avaliação do potencial discriminatório da origem botânica do mel de um sensor de baixo custo.

Por último, o projeto Mel I.D. inclui ainda duas tarefas relacionadas com a gestão e disseminação do projeto (Tarefa 5: Comunicação da ação e divulgação dos resultados, e Tarefa 6: Gestão e acompanhamento do projeto).

2. Atividades Previstas para o período do relatório e Atividades previstas para 2024

A Figura 1 apresenta o cronograma de atividades apresentado na submissão da candidatura ao PAN 2023-2027, Intervenção B.2.7.

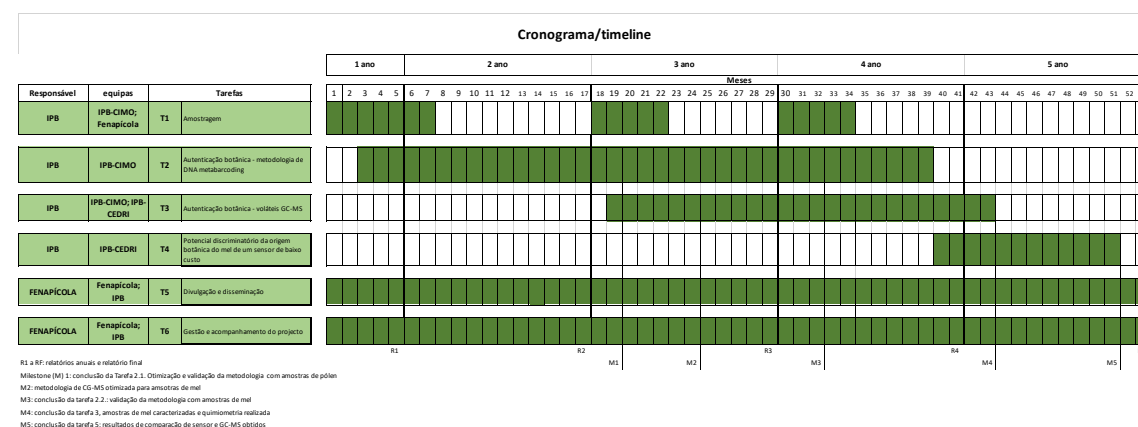


Figura 1. Cronograma do projeto Mel I.D.

Como apresentado na Figura 1, o 3º ano do projeto previa a realização de atividades no âmbito das tarefas T1 (Amostragem), T2 (Autenticação botânica – metodologia de DNA barcoding), T3 (Autenticação botânica – voláteis GC/MS), T5 (Divulgação e disseminação) e T6 (Gestão do projeto). De uma forma geral, as atividades previstas foram realizadas, como seguidamente detalhado.

A Tabela 1 apresenta as atividades e metas previstas para o terceiro ano de projeto

Tabela 1. Atividades e metas previstas para o terceiro ano de projeto

Ano	Atividades	Metas
Ano 3 (Ago-Jul) 2024-2025) 12 meses	- Iniciar a tarefa 2.2 “Otimização da metodologia de DNA barcoding em amostras de mel” - Iniciar a Tarefa 3.1” Análise por GC-MS”	- Fazer um levantamento das regiões em que são produzidos méis monoflorais em Portugal. Iniciar a amostragem de méis Portugueses. - Aquisição de amostras de pólen de espécies individuais de plantas. - Realizar as extrações de DNA e sequenciações das amostras individuais de pólen.

3. Atividades Realizadas para o período do relatório (Agosto 2024 – Julho 2025)

Tarefa 1 – Amostragem

No âmbito desta tarefa foram obtidos méis monoflorais de diferentes localizações (castanheiro, alecrim, eucalipto, rosmaninho, urze, laranjeira) de apicultores associados da Fenapícola. Algumas

destas amostras tinham análises polínicas realizadas. Foram também obtidas amostras de mel de incenso. Todas as amostras encontram-se em frascos de vidro por forma a não interferir com a análise de compostos voláteis. Adicionalmente, foram adquiridas amostras comerciais de mel monofloral de diferentes origens botânicas. Estas amostras, bem como as fornecidas pela Fenapícola que não dispõem de informação polínica, foram enviadas para melissopalínologia, estando-se a aguardar os resultados.

Tarefa 2 – Autenticação Botânica

Em geral, o grau de execução das atividades desta tarefa previstas para o 3º ano do projeto foi elevado. Foram realizadas atividades no âmbito das tarefas 2.1 e 2.2 em paralelo e dando continuidade do trabalho realizado no 2º ano de projeto.

Tarefa 2.1. Otimização da metodologia e validação com amostras de pólen

No 2º ano de projeto foram realizadas misturas com pólenes de 13 espécies de plantas, nomeadamente misturas de 5 pólenes selecionados pelo seu tamanho e dos 13 pólenes adquiridos. Em cada caso, foram preparadas duas misturas diferentes: uma preparada para conter uma massa igual de grãos de pólen das diferentes espécies (isto é, correspondendo a diferentes números de grãos de pólen para cada espécie) e outra contendo uma quantidade similar de cada pólen (isto é, número idêntico de grãos calculados com base nas contagens realizadas por microscopia). Cada mistura foi preparada através de pesagens individuais de cada um dos pólenes. Cada amostra individual de pólen foi submetida a extração de DNA utilizando o kit comercial de extração automática Maxwell RSC Pure Food GMO and authentication kit e o extrato obtido foi enviado para sequenciação Sanger. De forma similar, as misturas de pólen foram sujeitas a extração de DNA utilizando o mesmo kit, o extrato obtido foi quantificado por espectrofotometria, diluído a concentração de 10 ng/μL e submetido a PCR para incorporação dos primers ITS2. Posteriormente foi enviado para sequenciação por Next Generation Sequencing (DNA metabarcoding), sendo submetido a PCR de indexação, quantificação/normalização e sequenciação. Após tratamento dos dados recebidos, isto é, desmultiplicação dos pools no BaseSpace Sequence Hub com base nos indexes únicos incorporados no segundo PCR realizado pelo CIBIO (aquisição de serviços de sequenciação dado que o IPB não detém sequenciadores de NGS), as raw sequence reads (ficheiros Fastq) foram processadas utilizando o VSEARCH v2.14.1, e as sequências R1 e R2 foram combinadas usando o comando `fastq_mergepairs`. As sequências consenso obtidas foram depois filtradas (comprimento < 200 pb e > 500 pb, pares de bases ambíguos), desreplicadas, e as quimeras foram removidas. Desta forma foram obtidas as sequências finais (amplicon sequence variants (ASVs) as quais foram depois classificadas ao nível de espécie contra a base de dados contruída com a informação obtida por sequenciação Sanger, bem como através da realização de análises BLAST no NCBI. Os resultados obtidos indicaram que no geral os perfis qualitativos foram de encontro ao esperado, à exceção de *Zea mays* que não foi detetada quer na mistura com número idêntico de pólenes nem na mistura com massa igual de pólenes. Desta forma, e considerando que *Zea mays* apresenta polén de elevada dimensão, para analisar se esta espécie não foi detetada devido a problemas na extração, para cada pólen, o extrato de DNA obtido foi quantificado por fluorimetria (QuantiFluor™ dsDNA System) por forma a obter um valor de concentração de DNA mais preciso; com base nos valores obtidos foram feitas misturas dos extratos de DNA dos diferentes pólenes, garantido a presença de DNA de todos eles (informação detalhada no anexo III). Essas misturas de extratos de DNA foram igualmente amplificadas com os primers ITS2 e enviados para NGS, não se tendo verificado a presença de *Zea mays*. Desta forma, foi elaborada a hipótese de que os primers, apesar de descritos como universais, podem ter diferente afinidade para os fragmentos de DNA de diferentes espécies de plantas/pólen. Para testar esta hipótese, considerou-se testar outros primers para a região ITS2 bem como testar outras regiões cloroplastidiais.

Inicialmente, foram realizados testes com um novo set de primers para a região ITS2 (ITS-3p62pIF1/ITS-4unR1, sequências apresentadas no anexo III) com base em bibliografia recentemente publicada (Kolter et al., 2021), considerando igualmente que estes novos primers são também utilizados por equipas de investigação do CIBIO. O resultado dos testes realizados com as misturas de 13 pólen encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação de resultados de NGS realizados com os sets de primers 1 (ITS-S2F/ITS-S4R) e 2 (ITS-3p62pIF1/ITS-4unR1) a misturas contendo 13 espécies de pólen, e 13 espécies de pólen adicionados a xarope de agave.

Espécies de pólen		Mistura A		Mistura B		13 pólen em Agave	
		Primer set 1	Primer set 2	Primer set 1	Primer set 2	Primer set 1	Primer set 2
<i>Acer pseudoplatanus</i>	✓	5.5	15.5	4.1	8.5	7.1	8.8
<i>Ambrosia elatior</i>	✓	9.0	42.4	8.2	23.2	3.0	4.5
<i>Castanea sativa</i>	✓	8.5	-	10.5	-	6.8	-
<i>Corylus avellana</i>	✓	6.9	1.9	7.2	5.8	0.8	-
<i>Fagus sylvatica</i>	✓	11.9	-	13.3	-	9.7	7.1
<i>Chenopodium album</i>	✓	6.3	4.1	5.8	15.5	9.4	13.9
<i>Olea europaea</i>	✓	7.1	-	8.3	-	15.6	-
<i>Plantago lanceolata</i>	✓	17.9	22.3	17.8	34.9	17.4	31.3
<i>Quercus robur</i>	✓	3.2	-	3.4	-	7.5	2.6
<i>Salix caprea</i>	✓	11.2	-	10.7	-	7.0	-
<i>Sambucus nigra</i>	✓	3.0	-	3.1	-	12.1	19.9
<i>Tilia cordata</i>	✓	9.3	-	7.6	-	3.6	-
<i>Zea mays</i>	✓	-	-	-	-	-	-
<i>Ambrosia psilostachya</i>	X	-	-	-	-	-	7.6
<i>Chenopodium giganteum</i>	X	-	-	-	-	-	4.2
<i>Salix repens</i>	X	-	3.7	-	3.2	-	-
<i>Tilia tomentosa</i>	X	-	10.1	-	9.0	-	-

Com base nos resultados obtidos verificou-se que os primers inicialmente selecionados para amplificação da região ITS2 (ITS-S2F/ITS-S4R) obtiveram um melhor desempenho permitindo a identificação de todas as espécies à excepção de *Zea mays*. Pelo contrário os novos primers testados (ITS-3p62pIF1/ITS-4unR1) não permitiram a identificação de todas as espécies, adicionalmente tendo identificado 4 espécies diferentes, apesar destas pertencerem aos mesmos géneros dos pólen adicionados (*Ambrosia psilostachya*, *Chenopodium giganteum*, *Salix repens* e *Tilia tomentosa*).

Considerando que uma das 13 espécies não foi amplificada com qualquer dos sets de primers quando presente numa mistura (de pólen ou de DNA), sendo contudo amplificada quando presente como espécie única, o que pode indicar uma menor afinidade dos primers para esta (e potencialmente outras) espécie(s), decidiu-se realizar uma pesquisa bibliográfica para potencial selecção e teste de primers com target noutras regiões. Com base na bibliografia consultada, de entre vários barcodes de plantas referidos como potencialmente indicados para discriminação de espécies (ex., matK, ITS1, ITS2, rbcL, trnH-psbA, ycf1, trnL-trnF, psbK-psbI, psbA-trnK, trnD-trnT, trnS-trnG, entre outros) seleccionaram-

se *matK* e *rbcL* dada a quantidade de sequências disponíveis para estes marcadores e a sua utilização em estudos similares (pólen e/ou mel). Do estudo bibliográfico realizado, e considerando a utilização de NGS com a plataforma Illumina, a qual restringe o tamanho dos amplicons a cerca de 500 bp (utilizando um kit v3 e considerando a necessidade de emparelhamento de pelo menos 50 bp das sequências de sentidos opostos) foram testados diferentes primers para as regiões *trnL-trnF* (Figura 1) e *rbcL* (Figura 2) (informação adicional sobre os primers no anexo III).



Figura 1. Resultados de PCR com target na região *trnL-trnF*, utilizando os primers G-F/H-R, C-F/H-R e G-F/D-R.



Figura 2. Resultados de PCR com target na região *rbcL*, utilizando os primers *rbcL4-F/SI_Rev-R* e *rbcL367-F/rbcL556-R*.

Com base nos resultados obtidos (Figura 1), apesar de ser um fragmento maior com os primers G-F/D-R, o qual seria mais informativo logo mais discriminante, considerando que o tamanho da região *trnL* é muito variável entre espécies, poderia haver o risco de em algumas espécies o tamanho deste

fragmento ser maior do que o adequado para a plataforma Illumina. Adicionalmente, verificou-se que para algumas amostras (meis PT15, PT20) não se obteve amplificação, o que pode estar relacionado com eventual degradação de DNA e o tamanho elevado do fragmento (o que aumenta as probabilidades de ocorrência de fragmentação e não amplificação).

Desta forma, selecionou-se o par de primers C-F/H-R para estudos subsequentes.

No caso da amplificação com os dois pares de primers com alvo na região *rbcL* testados, verificou-se que, com os primers *rbcL4-F/SI_Rev-R*, para as mesmas duas amostras anteriores (meis PT15 e PT20) obteve-se muito fraca amplificação. Já para os primers *rbcL367-F/rbcL556-R* todas as amostras de méis e pólen amplificaram, gerando um fragmento de tamanho menor, o que confirma a hipótese de não amplificação devido a degradação de DNA nas amostras de méis. Apesar deste set de primers ser mais indicado para amostras complexas como o mel, sendo um fragmento mais pequeno contém menos informação, o que pode condicionar a identificação ao nível de espécie.

Desta forma, para a região *rbcL* selecionaram-se ambos os primers para os estudos subsequentes.

Considerando que a região *rbcL*, contrariamente à região *trnL*, não apresenta grande variabilidade de tamanho para diferentes espécies, procedeu-se a um estudo de otimização das temperaturas de annealing para ambas as reações (Figuras 3 e 4) por forma a tentar eliminar as bandas secundárias não específicas observadas na Figura 2.

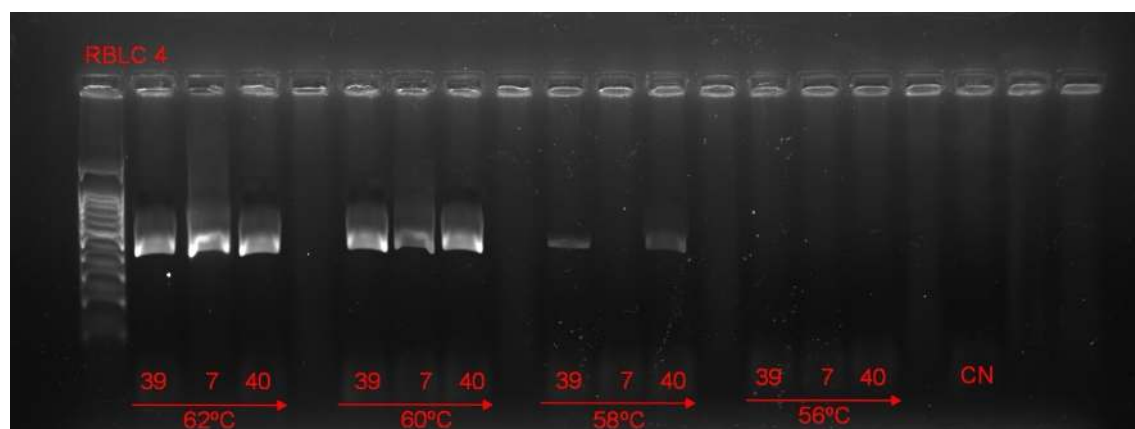


Figura 3. Gradiente de temperaturas de annealing aplicados ao set de primers *rbcL4-F/SI_Rev-R*.

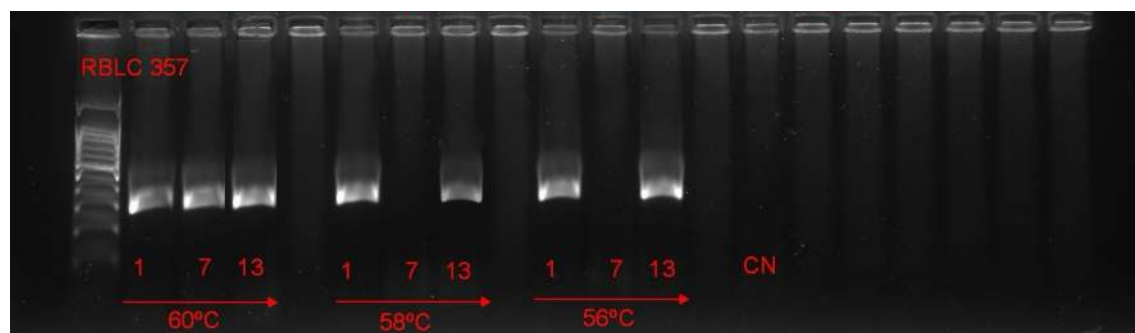


Figura 4. Gradiente de temperaturas de annealing aplicados ao set de primers *rbcL367-F/rbcL556-R*.

Com base nos resultados obtidos, selecionou-se a temperatura de annealing de 60°C para *rbcL367-F/rbcL556-R* e 62 °C para *rbcL4-F/SI_Rev-R*.

Seguidamente, todos os mesmos extratos de DNA correspondentes às misturas de pólen previamente formuladas (42 amostras diferentes) foram amplificados com os três sets de primers selecionados. Refira-se que para aumentar a variabilidade de tamanhos e propiciar uma sequenciação adequada na plataforma Illumina com a utilização de uma menor quantidade de PhiX, para cada set foi feita uma mistura com primers de tamanho de cauda diferentes (anexo III).

Atualmente, as amostras foram enviadas para o CIBIO para sequenciação e a equipa encontra-se a trabalhar na criação de novas bases de dados para tratamento dos resultados provenientes da sequenciação, isto é, uma nova base de dados com sequências da região *rbcL* e outra com sequências da região *trnL*.

Tarefa 2.2. Otimização da metodologia de DNA barcoding em amostras de mel

Nesta tarefa, procedeu-se à aplicação dos primers ITS2 em amostras de mel, tendo-se comparado a utilização do set inicialmente selecionado - ITS-S2F/ITS-S4R (Sickel et al., 2016) – com o set mais recentemente proposto na bibliografia para discriminação de espécies de plantas - ITS-3p62pIF1/ITS-4unR1 (nota: dado que as corridas de NGS são realizadas ou com Nanokit ou com kit v2, ambos de elevado custo, existe a necessidade de colocar um número razoável de amostras em cada corrida, para controlo/diminuição dos elevados custos associados – desta forma estas amostras foram sequenciadas juntamente com as amostras de pólen atrás descritas). Para a realização desta sequenciação, as mesmas amostras de mel foram lavadas e extraídas segundo o procedimento desenvolvido nos anos anteriores, tendo-se obtido extratos de DNA que foram amplificados com os dois sets diferentes de primers e enviados para o CIBIO para sequenciação por NGS. Os resultados obtidos encontram-se apresentados de forma resumida na tabela 3 (resultados detalhados apresentados no anexo III).

Tabela 3. Número de espécies de pólen identificadas em dez amostras de méis utilizando os dois sets de primers com target na região ITS2.

Amostra mel	Nº de espécies identificadas	
	ITS-S2F/ITS-S4R	ITS-3p62pIF1/ITS-4unR1
1	8	5
2	8	6
3	9	8
4	6	9
5	11	10
6	5	11
7	11	5
8	10	10
9	7	4
10	4	5

Verificou-se que de uma forma geral os primers iniciais (ITS-S2F/ITS-S4R; Sickel et al., 2016) permitiram identificar um maior número de espécies. Com base neste resultado, bem como no anteriormente descrito para as misturas de pólen, selecionou-se o set ITS-S2F/ITS-S4R para aplicação em amostras de mel.

Seguidamente, procedeu-se à lavagem e extração de um total de 32 méis portugueses. Os extratos obtidos foram quantificados por espetofotometria (anexo III). Inicialmente, testou-se a amplificação direta dos extratos sem diluição (Figura 5A). Tendo-se verificado que várias amostras não

amplificaram, o que pode ser devido à presença de inibidores da reação de PCR tais como polifenóis, procedeu-se à diluição dos extratos para 10 ng/μL e nova amplificação por PCR com os primers ITS-S2F/ITS-S4R (Figura 5B).

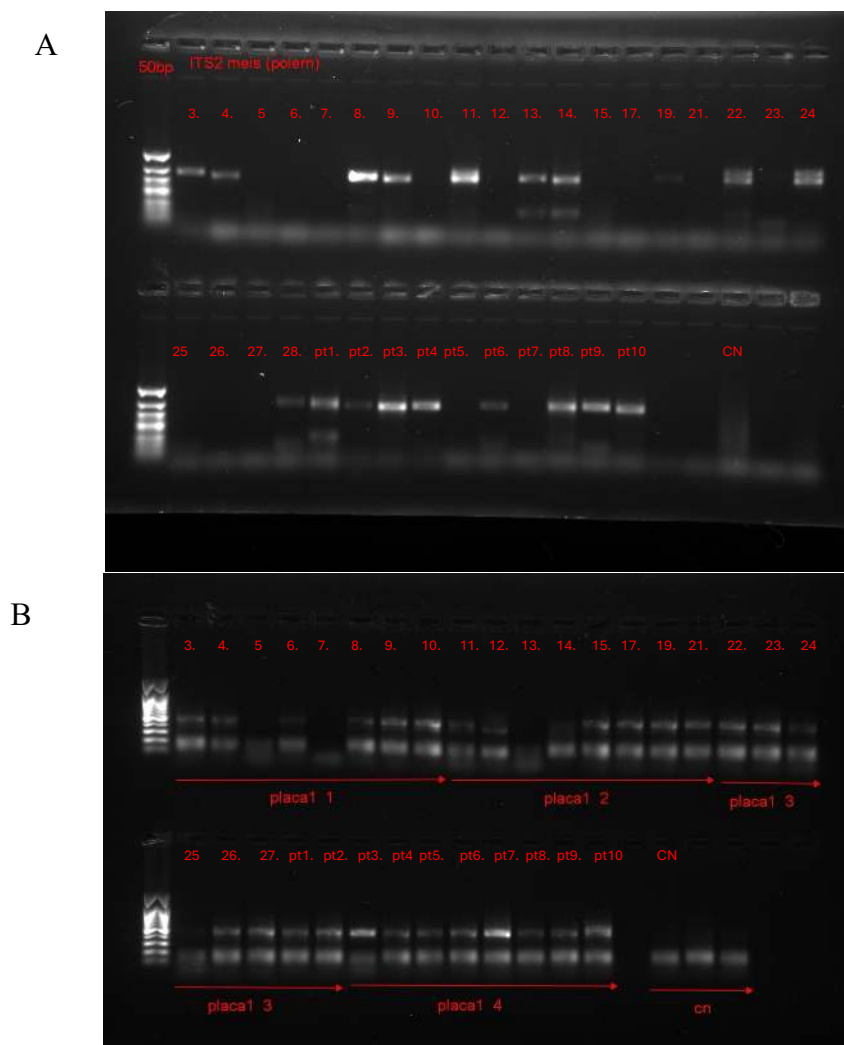


Figura 5. PCR com primers ITS2 de extratos de DNA de mel não diluídos (A) e diluídos a 10 ng/μL (B).

Os produtos de PCR foram enviados para o CIBIO para sequenciação e estamos atualmente a tratar os resultados.

Assim, pode-se concluir que o grau de execução das atividades da Tarefa 2 previstas para o 2º ano do projeto é muito elevada, uma vez que está de acordo com o previsto, tendo-se realizado trabalho adicional na Tarefa 2.1. devido aos resultados obtidos que conduziram à avaliação de novos primers.

Tarefa 3. Caracterização do perfil volátil de méis monoflorais Portugueses com vista à sua autenticação

Tarefa 3.1. Análise por GC-MS

O principal objetivo desta tarefa é otimizar o método de análise de compostos voláteis presentes em amostras de mel por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem (GC-MS/MS). Buscou-se determinar as melhores condições instrumentais para obtenção de picos mais definidos, intensos e representativos.

Preparação da amostra

Por forma a utilizar uma amostra representativa como controlo de qualidade (QC) para otimização do método, procedeu-se à elaboração de uma amostra composta (Figura 1) correspondendo à mistura equitativa de onze tipos de mel comercial: mel de mil flores, mel de laranjeira, mel de rosmaninho, mel de castanheiro, mel de urze, mel de limão, mel de eucalipto, mel de medronho, mel de alecrim, mel de acácia e mel de tomilho. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente até ao momento da análise.

Análise por GC-MS com Tool de Headspace

Inicialmente, estava previsto realizar as análises num GC-MS Shimadzu, mas tendo sido adquirido recentemente por um dos grupos de investigação do CIMO um GC-MS/MS triplo quadrupolo da ThermoScientific com amostrador automático para headspace, optou-se por utilizar este equipamento. Inicialmente foram realizados ensaios preliminares com a tool de headspace por forma a testar diferentes condições operacionais. As condições fixas foram o tempo total de análise de 26 minutos, temperatura de agitação de 50 °C, tempo de incubação de 20 minutos, temperatura da seringa de 60 °C e temperatura de operação de 240 °C. No entanto, algumas variáveis foram alvo de otimização, nomeadamente: massa da amostra, modo de injeção e volume de injeção.

Inicialmente, testaram-se diferentes massas de mel (2, 4 e 5 g) com a mesma proporção de água (1:1), usando um modo de injeção split com um split flow de 5. Posteriormente, testaram-se diferentes split flows (2,5, 5 e 10), bem como o modo splitless, para avaliar o impacto na definição e intensidade dos picos. De seguida, foi testada a substituição da água por uma solução saturada de NaCl, de forma a explorar o efeito de aumento de força iónica. Por fim, testaram-se diferentes volumes de injeção do headspace (1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mL), mantendo o modo split (split flow 5) e a adição de NaCl.

Nos ensaios de HS-GC-MS/MS, o aumento da massa de mel de 2 para 5 g resultou num aumento significativo da intensidade do sinal, com 5 g a apresentar o melhor desempenho global (Figura 6). No entanto, ao testar diferentes modos de injeção, verificou-se que o modo splitless levou à saturação do sinal e à sobreposição de picos, dificultando a identificação dos compostos. Por outro lado, o split flow 10 mostrou uma perda de sensibilidade significativa. O split flow 5 foi o que apresentou melhor equilíbrio entre definição dos picos e intensidade do sinal (Figura 7), tendo sido mantido nas experiências seguintes.

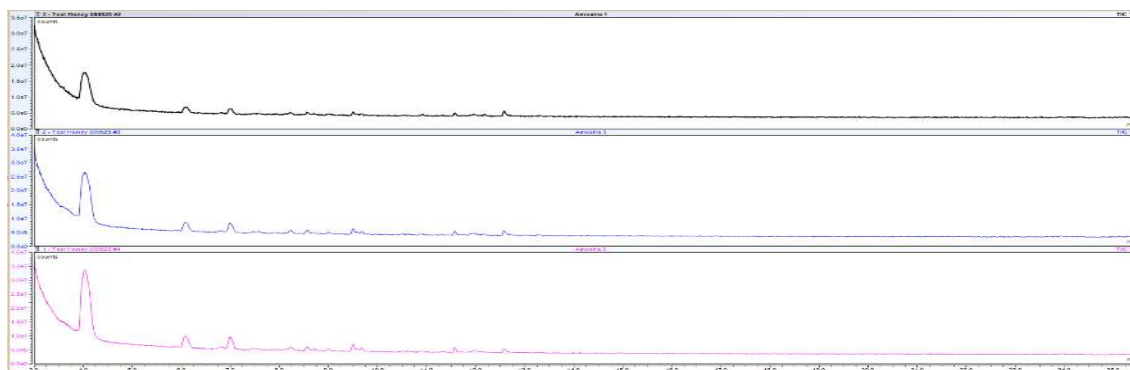


Figura 6. Teste com diferentes massas de mel na mesma proporção de água (m/v), 2:2, 4:4, 5:5, respetivamente.

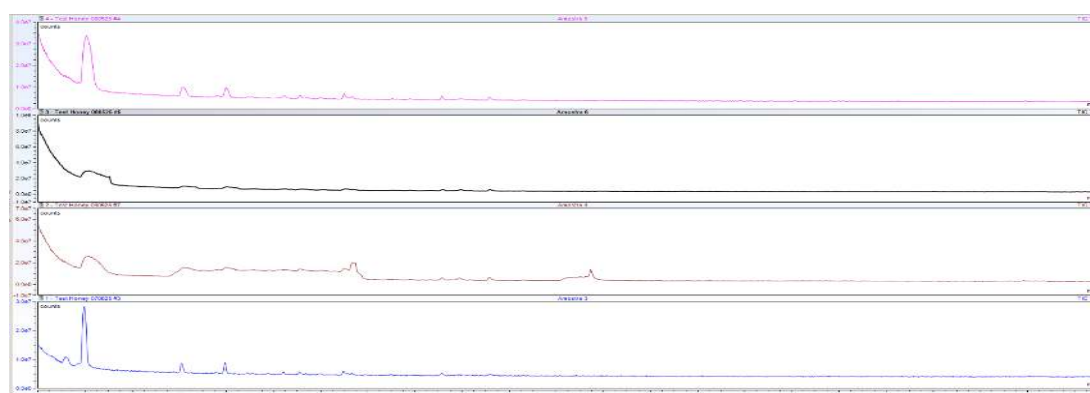


Figura 7. Teste a vários split flow: 5, splitless, 2,5 e 10, respetivamente.

A substituição da água por uma solução saturada de NaCl melhorou significativamente a intensidade dos sinais, como esperado devido ao efeito salting-out. Este efeito foi mais evidente com o split flow 5, confirmando a robustez desta condição.

Nos testes com diferentes volumes de injeção (Figura 8), observou-se que volumes superiores a 1,5 mL não melhoraram significativamente a resposta analítica e, em alguns casos, prejudicaram a reprodutibilidade. Assim, optou-se por manter um volume de injeção de 1,5 mL.

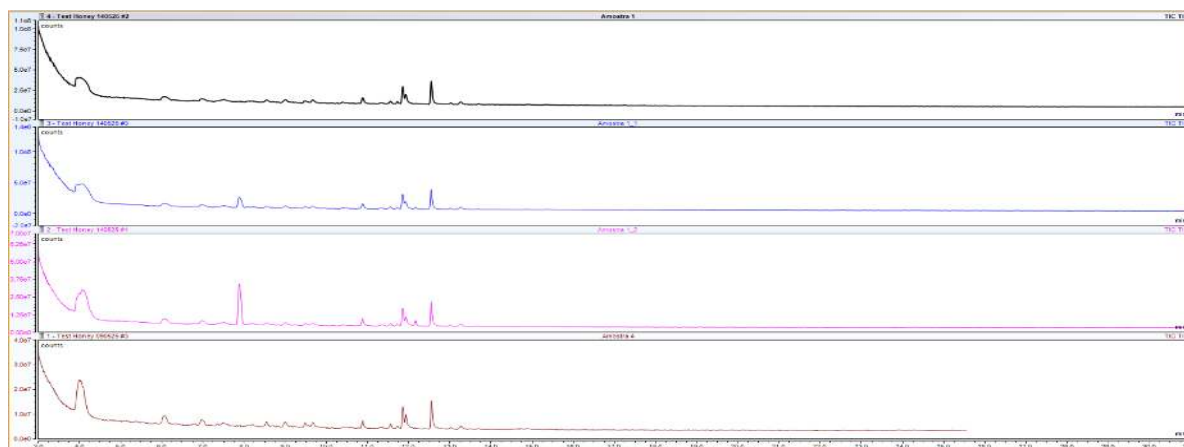


Figura 8: Teste no volume de injeção no GC: 2 mL, 2,5mL, 1,5mL e 1mL, respectivamente.

Com base em todos os testes realizados, concluiu-se que a melhor configuração para a análise de compostos voláteis em amostras de mel neste projeto inclui: *split flow* de 5, volume de injeção de 1,5 mL e substituição da água por solução salina (NaCl) na proporção 5:5 com o mel. Esta combinação demonstrou desempenho superior, com picos mais definidos, maior intensidade e boa repetibilidade analítica, em relação aos outros estudos identificados. Estas condições melhoraram significativamente a resposta analítica, com maior definição e intensidade dos picos cromatográficos. No entanto, apesar dessas melhorias, verificou-se que a técnica de headspace, tal como aplicada neste estudo, não permitiu obter resultados compatíveis com os reportados na literatura. A matriz complexa do mel e as limitações na extração eficiente dos compostos voláteis através de HS comprometeram a repetibilidade, a precisão e a robustez dos dados. Assim, devido aos problemas de reprodutibilidade e principalmente devido ao número reduzido de compostos obtidos, foi adquirida uma nova tool para o equipamento por forma a trabalhar com fibras de SPME (solid phase microextraction), permitindo a extração e concentração simultânea de analitos presentes no headspace. Com base nos resultados obtidos, com um número muito superior de picos, optou-se por prosseguir com a metodologia SPME-GC-MS/MS.

Análise por GC-MS com Tool de SPME

1. GC-MS – Condições cromatográficas

As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), utilizando um cromatógrafo gasoso Trace 1600 acoplado a um detetor de espectrometria de massa TSQ 9000 Triple Quadrupole, ambos da Thermo Fisher Scientific.

Para a separação dos compostos voláteis, foi utilizada uma coluna capilar do tipo TR-5MS (Thermo Scientific), com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. Esta coluna apresenta uma fase estacionária de baixa polaridade, adequada para a análise de compostos voláteis e semi-voláteis em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

O programa de temperatura do forno iniciou-se a 45 °C, sendo esta temperatura mantida durante 1 minuto. Seguiu-se uma rampa de aquecimento a 3 °C/min até aos 150 °C, e posteriormente uma segunda rampa a 5 °C/min até atingir 230 °C, temperatura final em que foi concluída a corrida analítica. O tempo total de corrida foi de 52 minutos. O gás de arraste utilizado foi hélio, com um caudal constante de 1,5 mL/min, assegurando uma separação eficiente e reprodutível dos analitos.

A aquisição dos dados foi realizada por espectrometria de massa, operando em modo de ionização por impacto eletrónico (EI) a 70 eV. O varrimento foi efetuado na gama de m/z 30–350, permitindo a deteção e identificação de uma ampla variedade de compostos. As temperaturas da interface e da fonte de ionização foram ambas mantidas a 250 °C, condições que asseguram uma volatilização adequada dos compostos e uma eficiente ionização para análise por espectrometria de massa. O hélio foi utilizado como gás de arraste, com um caudal constante de 1,5 mL/min.

2. *Extração em fase sólida (SPME)*

A extração dos compostos voláteis foi realizada por microextração em fase sólida (SPME) em modo headspace. Foram testadas duas fibras SMART SPME fornecidas pela Thermo Fisher Scientific, uma fibra DVB/PDMS (Divinilbenzeno/Polidimetilsiloxano), com 65 µm de espessura (violeta), e uma fibra DVB/CWR/PDMS (Divinilbenzeno/Carbon WR/Polidimetilsiloxano), com espessura de 50/30 µm (cinzento-escuro).

Por forma a testar o desempenho das duas fibras selecionadas com base na bibliografia, para cada ensaio, foram pesados 2,0 g de mel num vial de 5 mL, ao qual se adicionou 2 g de solução salina e selados para posterior homogeneização por agitação continua durante 15 segundos com auxílio do vortex. Ambas foram testadas com a amostra de mel composta, mantendo-se as restantes condições experimentais fixas. A avaliação foi feita com base no número total de picos e na área total do cromatograma. Os resultados foram comparados estatisticamente com recurso a um teste t-Student.

De forma a validar estatisticamente os resultados obtidos, foi aplicado um teste t-Student para comparação entre a soma das áreas das réplicas de ambas as fibras. Os resultados indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p=0,6 > 0,05$) entre as fibras testadas relativamente aos critérios avaliados. Esta ausência de significância sugere que, do ponto de vista estatístico, ambas as fibras apresentaram desempenhos comparavelmente idênticos. Desta forma, e considerando que a fibra DVB/CWR/PDMS apresenta um revestimento triplo o que poderá permitir a adsorção de compostos de uma gama mais alargada de famílias, foi selecionada esta fibra para as análises subsequentes. Esta decisão foi também suportada pela ampla utilização reportada na literatura científica, que destaca esta fibra como uma das mais eficazes em procedimentos analíticos semelhantes.

Após a escolha da fibra, avaliou-se o tempo de dessorção da fibra na entrada do injetor do GC. Foram testados dois tempos de dessorção (1 e 2 minutos com splitless time 1 min e 2 minutos com splitless time 2 min) mantendo constantes os restantes parâmetros operacionais. Para análise estatística dos dados recorreu-se ao teste ANOVA de um fator.

Relativamente ao tempo de dessorção, a ANOVA indicou uma diferença próxima do limiar de significância ($p = 0,0526$), com uma tendência favorável ao tempo de 2 minutos. Este valor, embora ligeiramente acima do limiar de significância de 0,05, indica a possibilidade de existir uma tendência para diferenças significativas entre os tempos testados. Apesar da análise estatística não confirmar uma diferença significativa ao nível de 95% de confiança, observou-se que o tempo de 2 min proporcionou uma extração mais eficiente, com valores elevados de área total (Figura 9). Assim, e tendo em conta a

proximidade do valor p ao limiar de significância, bem como a consistência dos resultados obtidos, foi escolhido o tempo de 2 min como o mais adequado para este método.

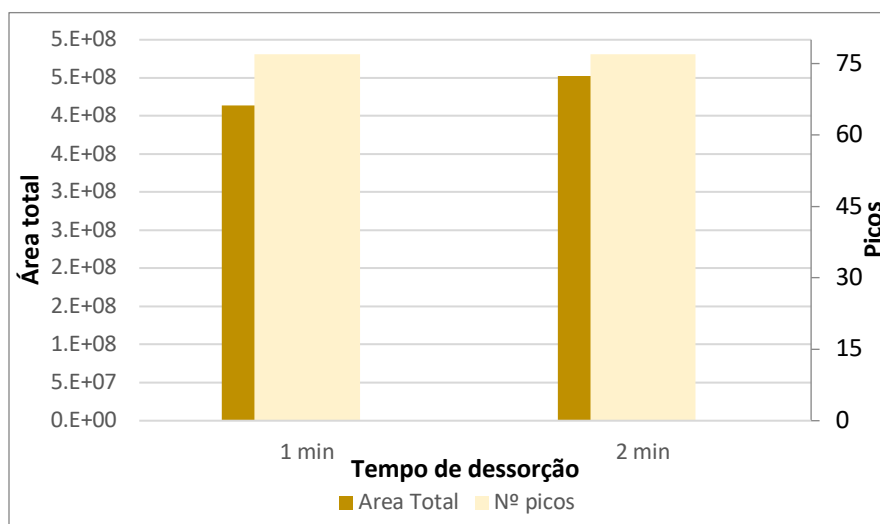


Figura 9. Efeito do Tempo de Dessorção na Área Total e no Número de Picos.

3. Estudo de otimização da extração em fase sólida (SPME)

Para a otimização das condições de extração por SPME, foi realizado um planeamento experimental com dois fatores (temperatura de incubação e de extração). Os ensaios foram realizados aleatoriamente e foram repetidos 4 pontos centrais para avaliar a reprodutibilidade. O planeamento experimental encontra-se apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Planeamento experimental para otimização das condições de extração por SPME.

	Ensaio	Tempo incubação/extração	Temperatura
PONTOS CENTRAIS	1	10,35	36,11
	2	34,65	36,11
	3	10,35	63,89
	4	34,65	63,89
	5	22,5	50
	6	22,5	50
	7	22,5	50
	8	22,5	50
	9	40	50
	10	22,5	70
	11	5	50
	12	22,5	30

Os resultados, expressos em número de picos detetados e área total cromatográfica, estão representados na Tabela 4 e Figura 10. Observa-se que os ensaios 3 e 4 (63,89 °C) e o ensaio 10 (70 °C) revelaram valores elevados em ambas as métricas, sugerindo uma extração mais eficiente em temperaturas mais elevadas.

Tabela 4. Resultados em nº de picos e área dos ensaios realizados no segundo planeamento experimental.

	Ensaio	Tempo extração	Temperatura incubação	Nº picos	Área
	1	10,35	36,11	62	184164553
	2	34,65	36,11	47	273579876
	3	10,35	63,89	136	671192136
	4	34,65	63,89	122	870314516
<i>PONTOS CENTRAIS</i>	5	22,5	50	71	411581185
	6	22,5	50	71	408548495
	7	22,5	50	71	403164017
	8	22,5	50	71	406468674
	9	40	50	76	644698741
	10	22,5	70	115	800176992
	11	5	50	58	143199608
	12	22,5	30	49	137289111

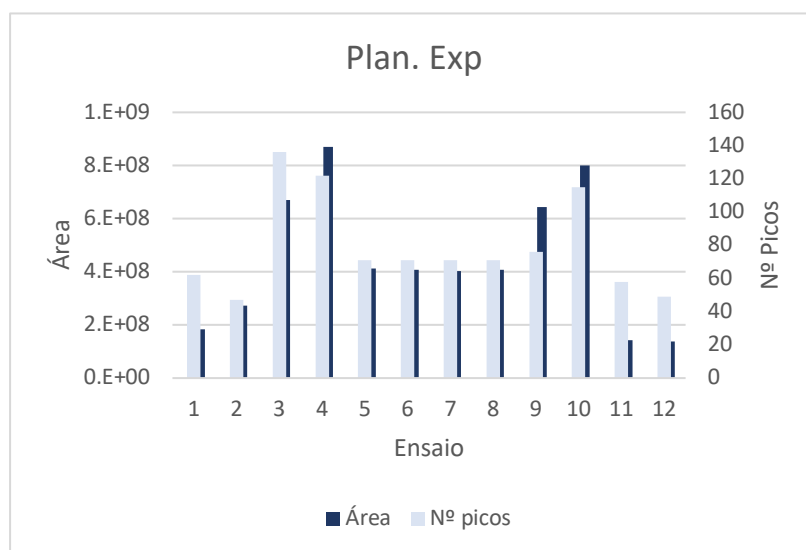


Figura 10. Representação da área cromatográfica total e número de picos para cada ensaio, para o segundo planeamento experimental.

No conjunto de ensaios realizados, o Ensaio 4 revelou a maior área obtida, com um valor de 870314516 counts*min (Tabela 4, Figura 11). Este ensaio foi conduzido com um tempo de extração de 34,65 minutos e uma temperatura de incubação de 63,89 °C. Em contraste, o Ensaio 12 (Figura 12)

apresentou a menor área registada, correspondente a 137289111 counts*min, tendo sido executado com um tempo de extração de 22,5 minutos e uma temperatura de incubação de 30 °C.

A comparação entre os dois ensaios permite concluir que a combinação de um tempo de extração mais prolongado e uma temperatura de incubação mais elevada, como aplicado no Ensaio 4, promove uma maior eficiência no processo de extração, refletida na área significativamente superior obtida.

Por outro lado, as condições do Ensaio 12 — com uma temperatura consideravelmente mais baixa e um tempo intermédio — poderão ter sido insuficientes para assegurar uma extração eficiente, justificando a área inferior registada.

Importa, contudo, ponderar que temperaturas demasiado elevadas ou tempos excessivos podem, em certos casos, promover a degradação de compostos termo-sensíveis, sendo, por isso, essencial encontrar um equilíbrio entre ambos os parâmetros.

Em suma, os dados obtidos demonstram que, no intervalo de condições testadas, o aumento simultâneo da temperatura e do tempo de extração teve um efeito sinérgico positivo na área obtida, sugerindo que estes fatores são determinantes para maximizar a eficiência do processo de extração. Todos os cromatogramas obtidos pelo planeamento experimental são apresentados na Figura 12.

Apesar de se observarem variações nos resultados consoante as condições testadas, os dados obtidos não permitem ainda identificar tendências claras e consistentes que sustentem a definição de condições ótimas. Por esse motivo, torna-se necessário aplicar uma modelação estatística, nomeadamente a metodologia de superfície de resposta (SRM), de forma a avaliar de forma sistemática os efeitos dos fatores e as suas interações. A aplicação de SRM indicou como ponto ótimo a utilização de 70 °C durante 40 min, como melhor condição de extração para análise de voláteis. Apesar da bibliografia indicar a formação de artefactos a temperaturas elevadas, com a utilização da incubação com injetor automático Triplus, não se verificou a formação de hidroximetilfurfural, contrariamente ao verificado com menor temperatura de extração (50 °C, 40 min) realizada em placa de aquecimento, como frequentemente reportado na bibliografia.

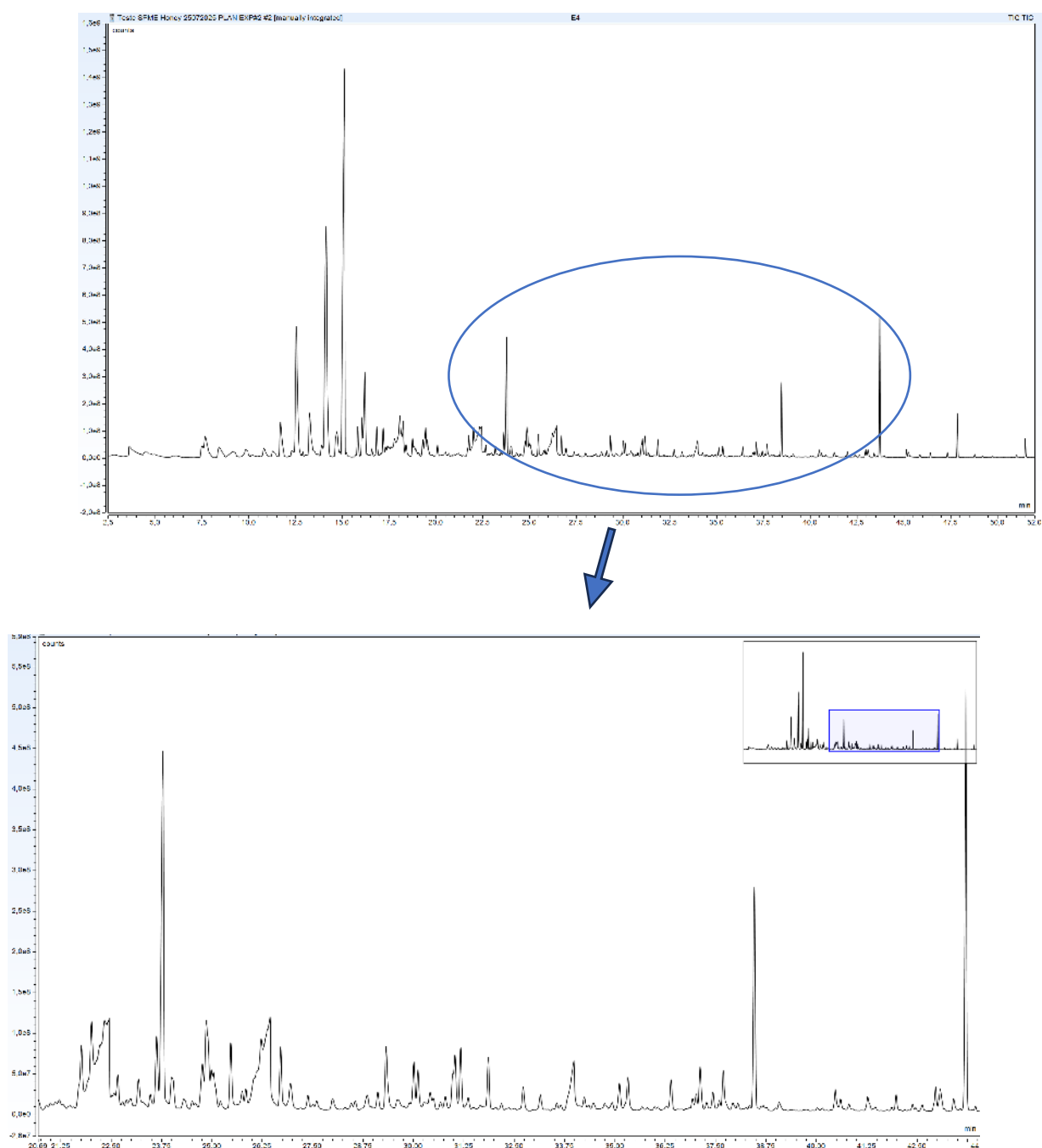


Figura 11. Ampliação da Região de Interesse do Cromatograma TIC para Melhor Visualização dos Compostos Menores, no ensaio 4, ensaio que se obteve a maior área.

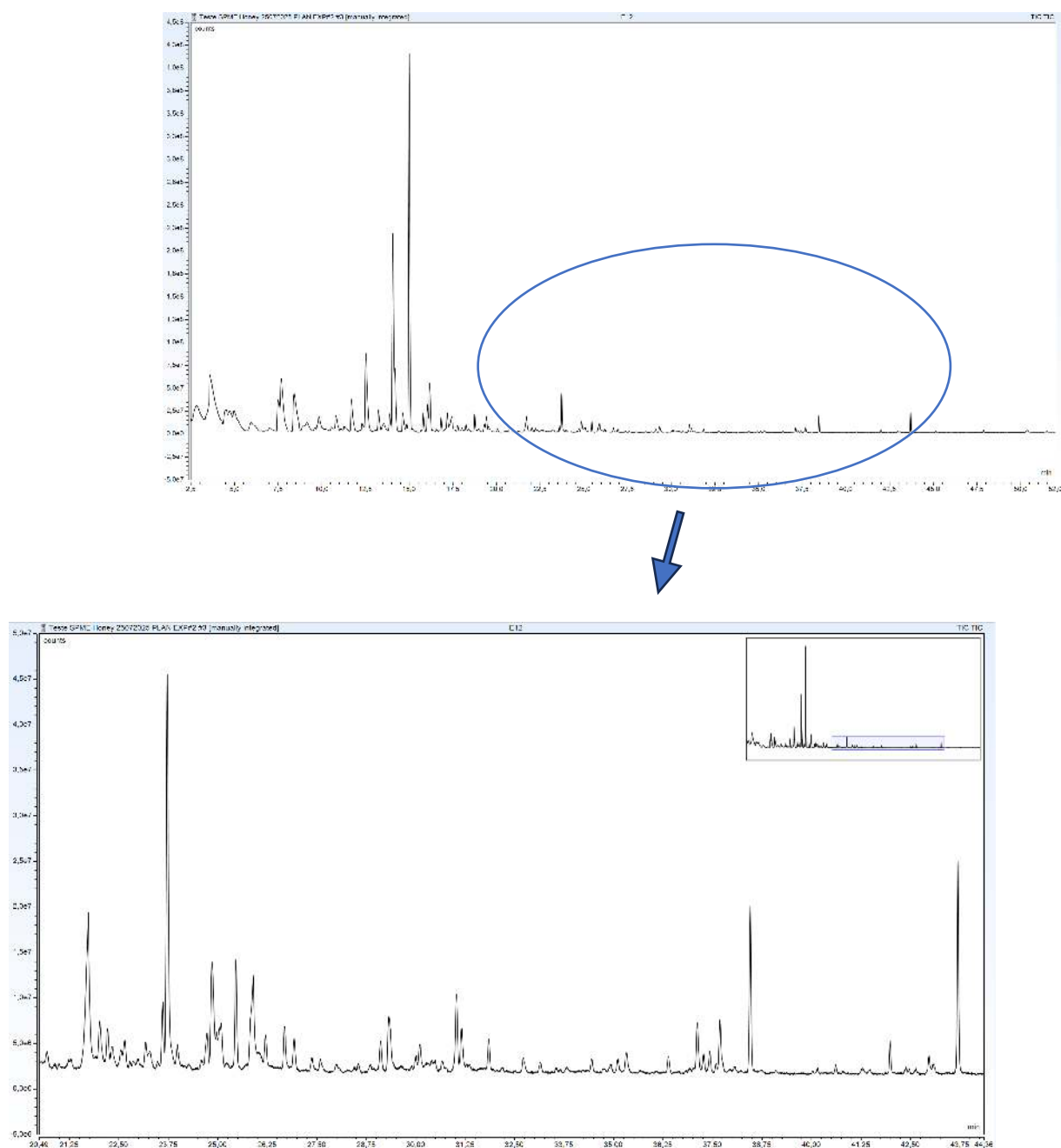


Figura 12. Ampliação da Região de Interesse do Cromatograma TIC para Melhor Visualização dos Compostos Menores, no ensaio 12, ensaio que se obteve menor área.

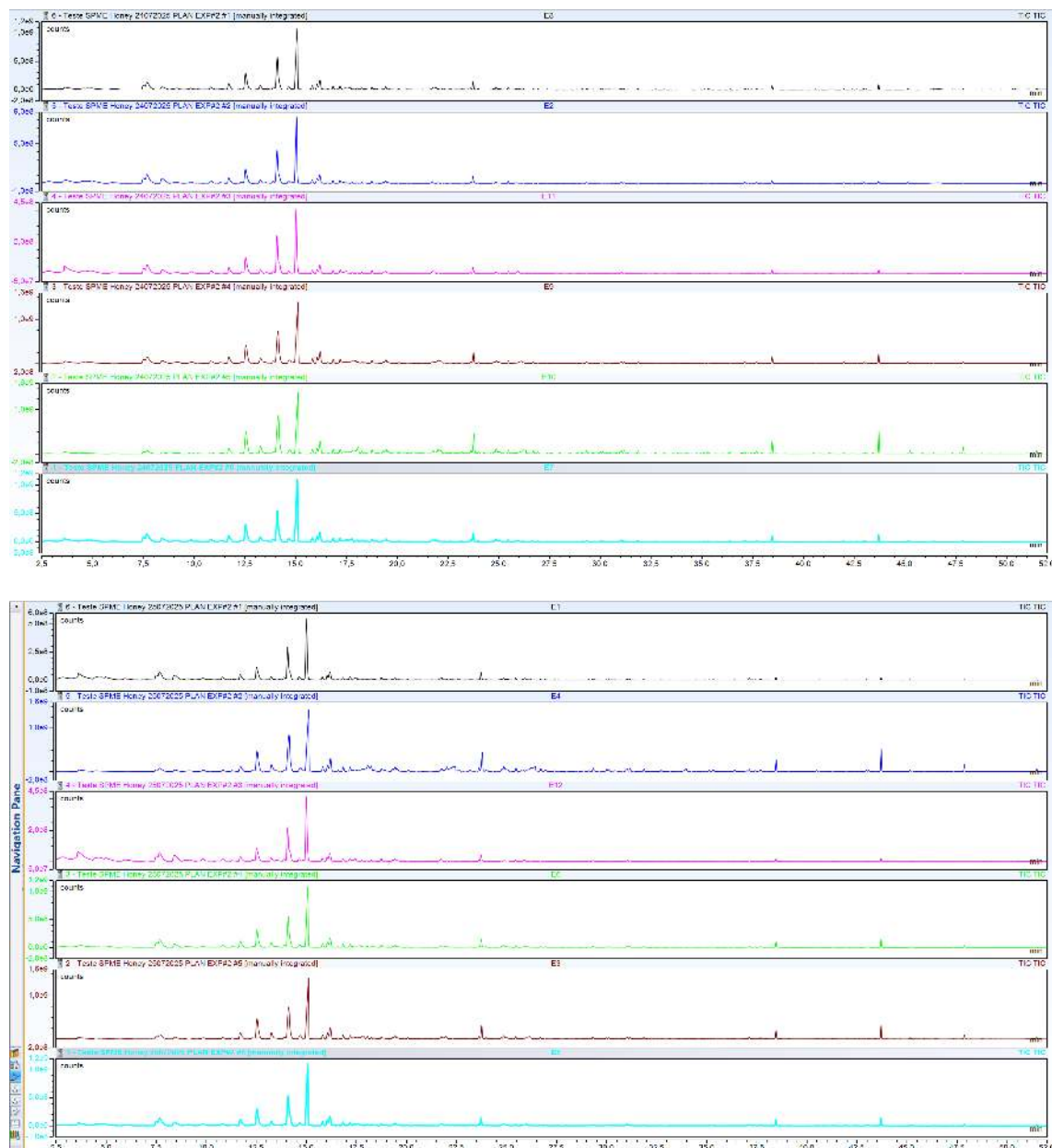


Figura 13. Cromatogramas obtidos na Análise de Compostos Voláteis em Mel via Planejamento Experimental e SPME-GC-MS.

Tarefa 5. Divulgação e disseminação.

Neste período, foram realizadas as seguintes atividades de divulgação e disseminação:

- uma apresentação oral no congresso XVII Química dos Alimentos, 9-11 de Outubro, Vila Real Congresso Nacional de Recursos Silvestres intitulada “Botanical authentication of honey:

comparison between ITS2 DNA-metabarcoding and pollen microscopy in multi-species mock mixtures”.

- Uma apresentação em formato poster no congresso internacional EurBee, 16-19 Setembro, Tallin, Estonia intitulada “ITS2 DNA-metabarcoding as a tool for the botanical authentication of honey: comparison with palynology analysis using mock mixtures”
- Uma apresentação em formato poster no congresso internacional 46º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, 3-6 Setembro, A Coruña, Spain intitulada “Evaluation of DNA-metabarcoding as a new approach for honey’s botanical authentication”.
- Uma apresentação em formato poster no congresso internacional XXIII EuroFoodChem, 11-13 June, Bratislava, Slovakia, intitulada “Botanical origin pollen mixtures and honey: comparison of two ITS2 primer sets for DNA-metabarcoding”
- Apresentação do projeto a apicultores nos dias 7, 9 e 11 de junho e distribuição de flyers na 61ª Feira Nacional de Agricultura entre 7 e 15 de junho de 2025.
- Apresentação do projeto e distribuição de flyers nos dias 19 e 20 de Outubro na 43ª edição do Festival de Gastronomia, Santarém, que decorreu entre 17 e 27 de Outubro de 2024.
- Foi mantido o website do projeto (<http://melid.ipb.pt>).

Tarefa 6. Gestão e acompanhamento do projeto.

De uma forma geral, a tarefa foi realizada segundo o previsto. No início do 3º ano de projeto foi realizada uma reunião zoom entre a Fenapícola (Bruno Martins e Dinis Silva) e o IPB (investigadora principal do IPB, Joana Amaral). Adicionalmente foram feitos diversos contactos telefónicos para obtenção das amostras, etc., conforme necessário.

Foram ainda realizadas diferentes reuniões presenciais entre os membros das equipas do IPB (CIMO e CeDRI) relativas à execução experimental /discussão de resultados.

Afetação real, em relação à prevista, dos meios humanos, materiais e financeiros na execução das atividades.

De uma maneira geral, a afetação de meios humanos, materiais e financeiros foi realizada segundo o previsto para o 3º ano de projeto.

3.Resultados alcançados

Resultados Tarefa 1 - Amostragem

Foram obtidas diferentes amostras de mel português, proveniente de apicultores e méis comerciais, correspondendo a um elevado grau de satisfação do projeto.

Resultados Tarefa 2 – Autenticação botânica

Tarefa 2.1. – Com base nos resultados do 2º ano de trabalhos, foi feita uma pesquisa bibliográfica para seleção de outras regiões e primers para além da região ITS2 que permitam esclarecer porque Zea

mays não é amplificada quando em presença de outras espécies e permita verificar se a utilização de mais do que uma região permite a obtenção de melhores resultados. Este trabalho está em curso, nomeadamente pelo desenvolvimento de duas novas bases de dados e tratamento dos resultados provenientes da sequenciação por NGS recentemente enviada para o CIBIO.

Tarefa 2.2. – Foi testado um novo set de primers ITS2, publicados recentemente e recomendado pelo CIBIO. Verificou-se que para as amostras de pólen e de mel os primers anteriores propostos por Sickel et al. 2017 se mostraram superiores. Foram testadas 32 amostras de méis portuguesas com estes primers; as mesmas amostras foram enviadas para melissopalínologia. Atualmente os dados obtidos encontram-se a ser tratados.

Resultados Tarefa 3 – Autenticação botânica: Análise de voláteis

Tarefa 3.1. – Análise por GC-MS

Foram testadas duas abordagens: análise direta do headspace utilizando uma tool específica para o braço robótico Triplus (ThermoScientific) e análise por SPME do headspace. Devido à maior sensibilidade na análise foi selecionado realizar o trabalho com fibra de SPME. Após da otimização das condições cromatográficas, foi feito um estudo para seleção da fibra a utilizar, tempo de incubação e tempo de dessorção. Seguidamente foi feito um estudo de otimização para seleção das condições de extração (tempo e temperatura) que permitam obter um maior número de picos e área total. Assim, para os estudos subsequentes de avaliação de amostras de mel Português, será utilizada a fibra DVB/CWR/PDMS, com tempo de dessorção de 2 min, e extração durante 40 min à temperatura de 70 °C.

5. Seguimento dos Indicadores

Apresenta-se o quadro de monitorização dos indicadores de desempenho propostos para o 3º ano do projeto.

Indicador de desempenho	Realização
Divulgação à comunidade científica	Sim – apresentação de 1 comunicação oral em congresso nacional; apresentação de 3 posters em congressos internacionais
Execução de atividades de divulgação/comunicação	Sim - Manutenção do website do projeto; Sim - Apresentação do projeto para a comunidade apícola na 61ª Feira Nacional de Agricultura Sim – Apresentação do projeto e distribuição de flyers no Festival Nacional de Gastronomia

6. Execução financeira

ANEXO II: DESPESAS POR ATIVIDADE

Atividades	Orçamento	Executado
Amostras	750.00 €	97.00 €
Recursos Humanos	14,000.00 €	14,098.00 €
Sequenciação/palinologia (aquisição de serviços (Tarefa 2)	5,000.00 €	4,936.00 €
Consumíveis/reagentes	5,250.00 €	5,032.00 €
Atividades de divulgação e disseminação (Tarefa 5)	8,300.00 €	9,167.00 €
Overheads (20%)	6,660.00 €	6,666.00 €
TOTAL	39,960.00 €	39,996.00 €

ANEXO III: DADOS DE ATIVIDADES EXPERIMENTAIS

Diluições para análise de NGS com primers ITS2.

		leitura do stock		dilui stock (30+30) H2O		diluido para 10ng		diluido para 3	
Acer pseudoplatanus	P1	64				9.2		2.63	
Ambrosia elatior	P2	67				8.2		3.11	
Castanea Sativa	P3	higher than std		90 (mais tarde higher)		24		3.29	
Corylus avellana	P4	20				7.4		3.95	
Fagus sylvatica	P5	21				9		2.98	
Chenopodium album	P6	14				25		3.4	
Olea europea	P7	100				29		2.48	
Plantago lanceolata	P8	74				9.4		3.03	
Quercus robur	P9	66				13		2.09	
Salix caprea	P10	109		72 (mais tarde 90)		16		2.76	
Sambucus nigra	P11	102				37		11	
Tilia cordata	P12	28				9		3.05	
Zea mays	P13	3.47				3.2			

diluir para 10	[inicial]	[final]	vol.final	vol.inicial	vol.H2O
P1	64	10	20	3.1	16.9
P2	67	10	20	3.0	17.0
P3	90	10	20	2.2	17.8
P4	20	10	20	10.0	10.0
P5	21	10	20	9.5	10.5
P6	14	10	20	14.3	5.7
P7	100	10	20	2.0	18.0
P8	74	10	20	2.7	17.3
P9	66	10	20	3.0	17.0
P10	72	10	20	2.8	17.2
P11	102	10	20	2.0	18.0
P12	28	10	20	7.1	12.9
P13	3.47	10	20	-	-

diluir para 3					
P1	9.2	3.2	20	7.0	13.0
P2	8.2	3.2	20	7.8	12.2
P3	24	3.2	20	2.7	17.3
P4	7.4	3.2	20	8.6	11.4
P5	9	3.2	20	7.1	12.9
P6	25	3.2	20	2.6	17.4
P7	29	3.2	20	2.2	17.8
P8	9.4	3.2	20	6.8	13.2
P9	13	3.2	20	4.9	15.1
P10	16	3.2	20	4.0	16.0
P11	102	3.2	20	0.6	19.4
P12	9	3.2	20	7.1	12.9
P13	3.2	3.2	20	-	-
P11 2º diluição	37	3.2	20	1.7	18.3

concentração final					
P1	2.63				
P2	3.11				
P3	3.29				
P4	3.95				
P5	2.98				
P6	3.4				
P7	2.48				
P8	3.03				
P9	2.09				
P10	2.76				
P11 2º dil	11				
P12	3.05				

[illegible]

leitura do stock		dilui stock em epp 30+30 H2O		diluido para 10ng			
P1	81				11		
P2	87				11		
P3	higher than std		87		11		
P4	28				9.2		
P5	27				11		
P6	59				7.6		
P7	higher than std		92		13		
P8	92				12		
P9	86				26		
P10	higher than std		43		12		
P11	higher than std		106	65	10		
P12	43				9.6		
P13	4.76						
diluição para 10 ng							
P1	81			10	30	3.7	26.3
P2	87			10	30	3.4	26.6
P3	87			10	30	3.4	26.6
P4	28			10	30	10.7	19.3
P5	27			10	30	11.1	18.9
P6	59			10	30	5.1	24.9
P7	92			10	30	3.3	26.7
P8	92			10	30	3.3	26.7
P9	86			10	30	3.5	26.5
P10	43			10	30	7.0	23.0
P11	106			10	30	2.8	27.2
P12	43			10	30	7.0	23.0
P13	4.76			10	30	-	-

quantidades = de DNA					quantidades = de DNA				
Misturar DNA					Misturar DNA				
amostra	[inicial]	V.final (10 ul)	[final] 0.25 ng/ul	V.inicial	amostra	[inicial]	V.final (25 ul)	[final] 0.25 ng/ul	V.inicial
P5	11	30	2	5.5	P1	11	30	0.7	1.9
P7	13	30	2	4.6	P2	11	30	0.7	1.9
P9	26	30	2	2.3	P3	11	30	0.7	1.9
P10	12	30	2	5.0	P4	9.2	30	0.7	2.3
P12	9.6	30	2	6.3	P5	11	30	0.7	1.9
			Total	23.6	P6	7.6	30	0.7	2.8
			H2O	6.4	P7	13	30	0.7	1.6
			[amostra]	10.0	P8	12	30	0.7	1.8
					P9	26	30	0.7	0.8
					P10	12	30	0.7	1.8
					P11	10	30	0.7	2.1
					P12	9.6	30	0.7	2.2
					P13	4.76	30	0.7	4.4
							Total		27.3
							H2O		2.7
							[amostra]		9.1
Quantidades diferentes					Quantidades diferentes				
Misturar DNA					Misturar DNA				
amostra	[inicial]	V.final (10 ul)	[final]	V.inicial	amostra	[inicial]	V.final (25 ul)	[final]	V.inicial
stock P5	27	20	1.80	1.3	stock P1	81	20	4.92	1.2
10ng P7	13	20	5.80	8.9	stock P2	87	20	5.15	1.2
10ng P9	26	20	2.60	2.0	10ng P3	11	20	1.85	3.4
10ng P10	12	20	3.20	5.3	10ng P4	9.2	20	0.57	1.2
stock P12	43	20	1.80	0.8	stock P5	27	20	1.62	1.2
		[amostra]	15.2	18.4	10ng P6	7.6	20	0.26	0.7
			h20	1.6	10ng P7	13	20	2.23	3.4
					10ng P8	12	20	0.72	1.2
					10ng P9	26	20	1.00	0.8
					10ng P10	12	20	1.23	2.1
					10ng P11	10	20	0.85	1.7
					stock P12	43	20	2.15	1.0
					stock P13	4.76	20	0.25	1.0
							[amostra]	22.8	20.1
							h20		-0.1

Sequências de primers trnL e rbcL

Primers trnL testados

Name	Sequence 5' - 3'
a	CATTACAAATGCGATGCTCT
b	TCTACCGATTTCGCCATATC
c	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
e	GGTTCAGTCCCTCTATCCC
f	ATTGAACTGGTGACACGAG
g	GGGCAATCCTGAGCCAA
h	CCATTGAGTCTCTGCACCTATC

Primers selecionados (incluindo primers com caudas de diferente tamanho)

trnL-C-F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGAAATCGGTAGACGCTACG

trnL-G-F: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCAATCCTGAGCCAA

trnL-H-R: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCATTGAGTCTCTGCACCTATC

trnL-D-R: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGGATAGAGGGACTTGAAC

trnL-C1N: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNCGAAATCGGTAGACGCTACG

trnL-C2N: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNCGAAATCGGTAGACGCTACG

trnL-H1N: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNCCATTGAGTCTCTGCACCTATC

trnL-H2N: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNCCATTGAGTCTCTGCACCTATC

Primers rbcL mais promissores após pesquisa bibliográfica

Bell2017	Palmieri2009	rbcL	rbcL2	Forward	TGGCAGCATTYCGAGTAACTC	approx . 500	vascular plants
Bell2017	Kress and Erickson2007	rbcL	rbcLa-R	Reverse	CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTC	approx . 500	vascular plants

Wilson2021	Palmieri2009	rbcL	rbcL2	Forward	TGGCAGCATTYCGAGTAACTC	449	vascular plants
Wilson2021	Kress and Erickson2007	rbcL	rbcLa-R	Reverse	CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTC	449	vascular plants

Khansaritoreh 2020	Erickson2017	rbcL	rbcL4	Forward	CTTACCAGYCTTGATCGTTACAAAGG	379	vascular plants	honey analyses
Khansaritoreh 2020	Kress2009	rbcL	SI_Rev	Reverse	GTAAAATCAAGTCACCCRCG	379	vascular plants	honey analyses

Aziz2017	new	rbcL	rbcL-357F	Forward	CATTGTRGGTAATGTATTTGG	198	vascular plants	diet
Aziz2017	new	rbcL	rbcL-556R	Reverse	ACATTCATAAACHGCYCTACC	198	vascular plants	diet

Primers testados

rbcL4-F **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**CTTACCAGYCTTGATCGTTACAAAGG

SI_Rev-R **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**GTAAAATCAAGTCACCCRCG

rbcL-357-F **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**CATTGTRGGTAATGTATTTGG

rbcL-556-R **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**ACATTCATAAACHGCYCTACC

Primers selecionados

rbcL4-1N-F – 5'- **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGN**CTTACCAGYCTTGATCGTTACAAAGG

rbcL4-2N-F– 5'- **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNN**CTTACCAGYCTTGATCGTTACAAAGG

SI_Rev-1N-R– 5'- **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGN**GTAAAATCAAGTCACCCRCG

SI_Rev-2N-R– 5'- **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNN**GTAAAATCAAGTCACCCRCG

rbcL-357-1N-F-5'- **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGN**CATTGTRGGTAATGTATTTGG

rbcL-357-2N-F-5'- **TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNN**CATTGTRGGTAATGTATTTGG

rbcL-556-1N-R-5'- **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGN**ACATTCATAAACHGCYCTACC

rbcL-556-2N-R-5'- **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNN**ACATTCATAAACHGCYCTACC

Primers testados adicionalmente para ITS2

ITS-3p62pIF1 **TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**ACBTRGTGTGAATTGCAGRATC

ITS-3p62pI-1N-F1 **TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGN**ACBTRGTGTGAATTGCAGRATC

ITS-3p62pl-2N-F1 **TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNACBTRGTGTGAATTGCAGRATC**

ITS-4unR1 **TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTCCGCTTATTKATATGC**

ITS-4un-1N-R1 **TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNTCCTCCGCTTATTKATATGC**

ITS-4un-2N-R1 **TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNTCCTCCGCTTATTKATATGC**

Resultados obtidos com diferentes primers para a região ITS2 (antigos: ITS-S2F/ITS-S4R; Sickel et al., 2016 e novos: ITS-3p62pIF1/ITS-4unR1; Kolter and Gemeinholzer, 2021).

Species	BM10.IT52		BM11.IT52		BM12.IT52		BM13.IT52		BM16.IT52		BM17.IT52		BM18.IT52		BM19.IT52		BM1.IT52		BM2.IT52		PHB.IT52	
	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo	novo
Castanea crenata	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0.0353	
Castanea sativa	0		0		0		0		0		0		0		0.0134		0		0		0.0973	
Citrus latifolia	0		0.0203		0		0		0		0.0299		0		0		0		0		0.0168	
Cupressus sempervirens	0		0		0		0		0		0		0		0.0647		0		0		0	
Echium plantagineum	0.0506	0.1866	0.3238	0.4170	0.1296	0.4390	0.1297	0.4046	0.3148	0.2346	0.1453	0.0358	0.2571	0.3845	0.2806	0.1101	0.6410	0.4865	0.0237	0.1288	0	
Eucalyptus boboryboles	0		0		0		0		0		0		0.0894	0.0767	0.1939	0.1462	0		0.2958	0	0.5763	
Foeniculum augustifolius	0		0		0		0		0		0		0		0		0.5457		0		0	
Galactes tomentosa	0		0		0		0		0	0.0533	0		0		0.0609		0.0257		0		0	
Heliopsis annuus	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0.1490	
Laburnum alpinum	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
Rhytus communis	0	0.2569	0.0380	0.2298	0	0.2252	0.0121	0.0781	0.0347	0.3036	0		0.0967		0.0231		0		0		0	
Quercus ciliaris	0	0.1629	0	0.0288	0.0541	0.0652	0.0179	0.1025	0.0108		0.0914	0.0798	0.1058	0.2955	0.0705	0.2112	0	0.1869	0.2208	0		
Pimpinella anisum	0		0		0.1234		0		0		0		0		0		0		0		0.0900	
Plantago lanceolata	0		0		0		0		0.0206		0		0		0		0		0		0	
Populus nigra	0		0		0.0151		0.0422		0.0203		0.0422		0.0228		0.0223		0		0.2608		0	
Potentilla crantzii	0.4387		0.2433		0.4293		0.7767		0.2891		0.5874		0.0841		0.2070		0.3293		0.2097	0		
Pteridium aquilinum	0		0		0		0		0.0779		0		0		0		0		0		0	
Quercus ilex	0.0661		0.0419		0.0249		0.0236		0.0287		0		0.0516		0.6415		0		0		0.0838	
Sedum album	0		0		0		0		0		0		0.1388		0		0		0		0	
Sedula rubra	0.0642	0.1472	0.0702		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
Rubus radiola	0.0610		0		0	0.0547			0.1495	0.2645	0.0283		0.0909	0.1052	0.1685	0.1860	0		0		0.3269	
Salvia glauca	0		0		0		0		0		0		0		0.3565		0		0		0	
Solanum lycopersicum	0.0980		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
Tofieldium fragiferum	0		0.1616		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
Tofieldium repens	0.1085		0		0.0249		0		0.0340		0		0		0.0365		0		0		0	
Tofieldium rydbergianum	0.1228		0.1010	0.3751	0.1346		0	0.0339	0.0988	0.1313	0.0540		0.0937	0.1031	0		0		0.3463	0		
Tofieldium spumosum	0		0		0	0.1078	0.0399	0.0966	0.0321	0.1056	0		0.0956	0.1835	0		0		0		0	
Andryala integrifolia							0.1173			0.0206	0					0.0624		0.1285				
Torilis avernensis	0.0380		0.0377		0.0664				0.0264		0.0459											
Quercus excolora			0.0117						0.0264		0.0459											
Tolpis barbata					0.0156		0.0487															
Tofieldium rithmocarpum					0.0261		0.0824				0.0931								0.1226			
Mosses marina											0.0984											
Plantago lagotis									0.0703													
Eryngium campestre													0.0599		0.4402							
Crepis capillaris															0.1005				0.1068			
Scium urbanum															0.0602							
Cirsium repens																						0.4537

	PT15 novo	PT15 antigo	PT18 novo	PT18 antigo	PT20 novo	PT20 antigo
Acer pseudoplatanus		0.0112				0.0349
Callistemon salignus				0.1594		
Castanea sativa		0.0674		0.0655		
Fagus sylvatica		0.0337				0.0200
Lotus creticus				0.2257		
Olea europaea		0.1011		0.0178		0.0125
Plantago lanceolata		0.0112	0.0771	0.0129		
Punica granatum				0.4935		
Quercus robur		0.1348		0.0113		0.0948
Rubus radula	1.0000	0.5056			1.0000	0.8204
Salix repens		0.1011		0.0138		0.0175
Sambucus nigra		0.0112				
Tilia tomentosa		0.0225				
Galactites tomentosus			0.2531			
Sinapis alba			0.6566			
Trifolium isthmocarpum			0.0132			
currida BD polen						
	D3.2		Mix13A		Mix13B	
Espécie declarada	novo	antigo	novo	antigo	novo	antigo
Acer pseudoplatanus	0.0885	0.0710	0.1546	0.0553	0.0854	0.0408
Ambrosia elatior		0.0302		0.0898		0.0821
Castanea sativa		0.0680		0.0855		0.1045
Corylus avellana		0.0084	0.0194	0.0691	0.0583	0.0724
Fagus sylvatica	0.0707	0.0966		0.1189		0.1334
Chenopodium album	0.1389	0.0936	0.0413	0.0634	0.1547	0.0579
Olea europaea		0.1562		0.0713		0.0829
Plantago lanceolata	0.3134	0.1736	0.2230	0.1789	0.3489	0.1780
Quercus robur	0.0259	0.0752		0.0322		0.0344
Salix caprea		0.0702		0.1125		0.1070
Sambucus nigra	0.1994	0.1213		0.0303		0.0311
Tilia cordata		0.0357		0.0928		0.0757
Zea mays						
Ambrosia artemisiifolia	0.0450		0.4239		0.2315	
Ambrosia psilostachya	0.0762					
Chenopodium giganteum	0.0421					
Salix repens			0.0367		0.0316	
Tilia tomentosa			0.1010		0.0896	
	6 generos		6 generos		7 generos	

Cálculo da concentração e pureza dos extratos de DNA de mel Português (leituras por espetofotometria)

Content	dsDNA concentration: (50 * x) * Dilution(x) in ng/μl (calculated)	Ratio 260 / 280	Ratio 260 / 230
Blank B			
Blank B			
3	80.275	1.9	1.23
3	105.77	1.7	1.52
4	40.75	1.8	1.04
4	54.555	1.6	1.32
5	32.895	1.6	0.81
5	35.22	1.6	0.83
6	23.18	1.6	1.23
6	23.98	1.6	1.06
7	105.335	1.5	0.76
7	115.4	1.5	0.78
8	416.17	1.8	1.81
8	371.17	1.8	1.78
9	40.335	1.7	1.2
9	40.285	1.7	1.18
10	103.315	1.9	2.01
10	107.27	1.9	1.52
11	104.15	1.6	0.78
11	128.46	1.6	0.73
12	19.995	1.9	0.46
12	17.42	1.7	0.57
13	55.745	1.3	1.71
13	70.415	1.4	1.21
14	292.945	1.7	2.47
14	285.035	1.7	2.47
15	55.67	1.5	1.7
15	43.785	1.4	1.71
17	27	1.7	0.61
17	16.95	1.5	0.99
19	81.97	1.6	0.93
19	81.71	1.7	0.65
21	39.715	1.7	1.2
21	43.23	1.7	1.23
22	81.2	1.7	1.54
22	81.26	1.7	1.53
23	16.375	1.6	1.06
23	14.095	1.7	1.08
24	72.52	1.7	1.44
24	70.68	1.7	1.43
25	31.135	1.3	0.61
25	25.82	1.2	0.64
26	100.2625	1.8	1.65
26	141.7875	1.8	1.76
27	22.0975	1.6	1
27	20.0175	1.6	1.09
28	21.5225	1.4	0.61
28	17.6825	1.5	0.66
29	73.8025	1.7	1.31
29	68.5275	1.6	1.23
ptn1	17.6025	1.7	0.72
ptn1	14.2725	1.6	0.66
ptn2	248.1975	1.8	1.77
ptn2	128.8325	1.8	1.87
ptn3	62.4975	1.7	1.14
ptn3	72.4575	1.7	1.17
ptn4	41.3125	1.6	1.02
ptn4	38.9725	1.5	0.85
ptn5	34.5925	1.6	1.09
ptn5	34.4125	1.6	1.1
ptn6	59.9525	1.8	1.45
ptn6	48.1375	1.7	1.48
ptn7	94.4125	1.8	1.76
ptn7	96.4025	1.8	1.71
ptn8	27.1425	1.7	1.03
ptn8	27.1675	1.7	0.92
ptn9	134.2475	1.8	1.92
ptn9	123.5175	1.8	1.94
ptn10	77.7375	1.7	1.07
ptn10	83.8525	1.7	0.93



ANEXO XI -