



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS  
FACULDADE DE QUÍMICA**

**KAMILA DIAS GONÇALVES**

**EFEITOS DA FERMENTAÇÃO NATURAL SOBRE OS PARÂMETROS  
FÍSICO-QUÍMICOS DO MEL DE ABELHA SEM FERRÃO *Melipona  
flavolineata* (uruçu – amarela) DO ESTADO DO PARÁ**

**BELÉM  
2017**

**KAMILA DIAS GONÇALVES**

**EFEITOS DA FERMENTAÇÃO NATURAL SOBRE OS PARÂMETROS  
FÍSICO-QUÍMICOS DO MEL DE ABELHA SEM FERRÃO *Melipona  
flavolineata* (uruçu – amarela) DO ESTADO DO PARÁ**

Monografia Apresentada à  
Faculdade de Química da  
Universidade Federal do Pará  
como requisito para obtenção do  
grau de Químico Industrial.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa  
Albres Botelho Amorim  
Furtado.

**BELÉM  
2017**

**KAMILA DIAS GONÇALVES**

**EFEITOS DA FERMENTAÇÃO NATURAL SOBRE OS PARÂMETROS  
FÍSICO-QUÍMICOS DO MEL DE ABELHA SEM FERRÃO *Melipona  
flavolineata* (uruçu – amarela) DO ESTADO DO PARÁ**

Monografia apresentada à faculdade de química da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Químico Industrial.

Data da defesa: 18/04/2017

Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Albres Botelho Amorim Furtado  
Universidade Federal do Pará – UFPA

---

Prof. Dr. Cristiano Menezes  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

---

Me. Kamila Leão Leão  
Doutoranda em Ecologia pelo programa de Pós-Graduação em Ecologia (PPGECO) da  
Universidade Federal do Pará em convênio com a Embrapa Amazônia Oriental  
(UFPA/EMBRAPA).

---

Prof. Dr. Heronides Adonias Dantas Filho  
Faculdade de Química ICEN - UFPA

## AGRADECIMENTOS

Infinitamente grata a Deus pelo dom da vida, pela família maravilhosa à qual pertencço e por todas as oportunidades que me proporcionou até aqui;

À minha família por todo incentivo, em especial aos meus pais Pedro Bento Souza Gonçalves e Rosa Cristina Dias Gonçalves pelo apoio, amor e carinho e por terem dado tudo de si para que eu chegasse até aqui, a eles meu amor incondicional;

À minha amada irmã Erika Luiza Dias Gonçalves, meu sobrinho que é meu pedacinho do céu Arthur Henrique Gonçalves Ferreira e meu padrasto Edu da Silva Brito por todo carinho e motivação;

Ao meu esposo Max Jhonis Lopes Chaves pelo amor sem medidas, pelo incentivo, pela compreensão, pela preocupação e por todo carinho;

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade de formação neste curso;

Aos professores desta universidade por todo conhecimento repassado;

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Albres Botelho Amorim Furtado pela disponibilidade, dedicação, paciência e carinho. Muito obrigada por todos os conselhos, profissionais e pessoais;

Ao Prof. Dr. Cristiano Menezes pelas sugestões e disponibilidade da matéria-prima;

Ao LANAGRO-PA pela disposição do Laboratório de Bebidas e Vinagre (LABEV) para realização de algumas análises e no qual realizei meu estágio. Agradeço especialmente ao técnico de laboratório Raimundo Joaquim Chaves pelas sugestões, auxílio nas análises e principalmente pela amizade singela que construímos;

Aos Dr. Hervé Rogez, responsável químico, e Risaldo A. Júnior, responsável técnico do Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Amazônia – CVACBA pelo apoio com as análises de polifenóis totais;

Às técnicas de laboratório Suelí e Rose do laboratório de Microbiologia do curso de Engenharia de alimentos pela paciência, disponibilidade e por todo auxílio nas análises microbiológicas;

Aos amigos e colegas do curso de Química Industrial 2013 pelo companheirismo,  
amizade e cumplicidade ao longo do curso;

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram em mais esta etapa da minha vida;

**MUITÍSSIMO OBRIGADA A TODOS!!!**

“É impossível haver progresso sem mudança e quem não consegue mudar a si mesmo não muda coisa alguma”.

***George Bernard Shaw***

## RESUMO

Amostras de mel produzido por abelhas sem ferrão *M. flavolineata* (urucu-amarela) provenientes de Belém do Pará foram analisadas quanto às suas características microbiológicas e físico-químicas, com o objetivo de avaliar os efeitos que a fermentação natural causa nas características físico-químicas do mel ao longo do tempo. As amostras foram coletadas de 5 diferentes potes de mel dispostos em cinco caixas racionais nos seguintes tempos: 7, 14, 21, 31, 35 e 45 dias. As amostras foram coletadas através de pipetas descartáveis e transferidas para recipientes plásticos esterilizados de 50mL. Após a coleta das amostras, estas foram mantidas sob-refrigeração até o momento dos ensaios. As análises físico-químicas e microbiológicas realizadas foram: acidez, pH, açúcares, sólidos solúveis, umidade, atividade de água e polifenóis totais, coliformes, bolores e leveduras e contagem de bactérias. A fermentação do mel foi comprovada pela diminuição dos açúcares totais e pelo alto conteúdo de umidade. A acidez total aumentou ao longo dos 45 dias e conseqüentemente o pH diminuiu. A atividade de água não sofreu variações significativas no decorrer do tempo. Notou-se pequeno aumento dos sólidos solúveis ao longo do tempo, assim como o aumento de polifenóis totais. Todas as amostras apresentaram resultado negativo para coliformes. Os resultados das análises de bolores e leveduras e de contagem padrão de bactérias apresentaram tendência a diminuir nas últimas análises das amostras. A fermentação natural no mel de *M. flavolineata* pode acrescentar substâncias que são benéficas e importantes ao mel.

Palavras-chave: Mel de abelha sem ferrão. Análises físico-químicas. *Melipona flavolineata*. Fermentação natural.

## ABSTRACT

Samples of honey produced by stingless bees *M. flavolineata* (urucu-amarela) from Belém of Pará were analyzed for their microbiological and physico-chemical characteristics with the objective to evaluate the effects of natural fermentation on the physicochemical characteristics of honey over time. The samples were collected from 5 different pots of honey arranged in five rational boxes in the following times: 7, 14, 21, 31, 35 and 45 days. The samples were collected through disposable pipettes and transferred to 50mL sterilized plastic containers. After collect of samples, they were kept under refrigeration until the time of the tests. The physical-chemical and microbiological analyzes were: acidity, pH, sugars, soluble solids, humidity, water activity and total polyphenols, coliforms, molds and yeasts, and bacterial counts. The fermentation of honey was evidenced by the decrease of the total sugars and by the high humidity content. The total acidity increased over the 45 days and consequently the pH decreased. The water activity didn't suffer significant variations over time. It was noted a small increase in soluble solids over time, as well as an increase in total polyphenols. All the samples showed negative results for coliforms. The results of the analyzes of mold and yeast and standard bacterial counts showed a tendency to decrease in the last analyzes of the samples. The natural fermentation in honey of *M. flavolineata* can add substances that are beneficial and important to honey.

Keywords: Bee stingless honey. Physicochemical analyzes. *Melipona flavolineata*. Natural fermentation.

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – MÉDIAS DOS TEORES DE ACIDEZ (meq/kg) E AÇÚCARES TOTAIS (g/100g) EM AMOSTRAS DE MÉIS “IN NATURA” DE <i>M. flavolineata</i>	34
GRÁFICO 2 – MÉDIAS DOS TEORES DE pH E ATIVIDADE DE ÁGUA EM AMOSTRAS DE MÉIS “IN NATURA” DE <i>M. flavolineata</i>	35
GRÁFICO 3 – MÉDIAS DOS TEORES DE SÓLIDOS SOLÚVEIS, UMIDADE E POLIFENÓIS TOTAIS EM AMOSTRAS DE MÉIS “IN NATURA” DE <i>M. flavolineata</i>	36

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES MÍNIMOS DE ATIVIDADE DE ÁGUA PARA O DESENVOLVIMENTO DE MICROORGANISMOS	22
TABELA 2 – PADRÃO DE QUALIDADE DE MELADO, MELAÇO, RAPADURA E SIMILARES	24
TABELA 3 – PADRONIZAÇÃO DA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA MEL DE MELIPONÍNEOS – PROPOSTA POR VILLAS – BÔAS E MALASPINA (2005) E REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E PADRÃO PARA O MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO – PROPOSTA POR CAMARGO ET AL. (2017)	24
TABELA 4 – RELAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE REFRAÇÃO E A PORCENTAGEM DE ÁGUA DOS MÉIS	30
TABELA 5 – RESULTADO DAS ANÁLISES DO XAROPE PURO	33
TABELA 6 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NESTE TRABALHO COM AS PROPOSTAS DE LEGISLAÇÃO PARA O MEL DE ABELHA SEM FERRÃO	38
TABELA 7 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE COLIFORMES EM AMOSTRAS DE MÉIS “IN NATURA” DE <i>M. flavolineata</i>	39
TABELA 8 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE BOLORES E LEVEDURAS EM AMOSTRAS DE MÉIS “IN NATURA” DE <i>M. flavolineata</i>	40
TABELA 9 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE MÉIS “IN NATURA” DE <i>M. flavolineata</i>	41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
3.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE ABELHAS SEM FERRÃO	15
3.2	ABELHA SEM FERRÃO <i>Melipona flavolineata</i>	16
3.3	FERMENTAÇÃO	17
3.4	MICROBIOLOGIA DO MEL	18
3.5	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL	19
<b>3.5.1</b>	<b>ACIDEZ</b>	19
<b>3.5.2</b>	<b>pH</b>	20
<b>3.5.3</b>	<b>AÇÚCARES</b>	20
<b>3.5.4</b>	<b>SÓLIDOS SOLÚVEIS</b>	21
<b>3.5.5</b>	<b>UMIDADE</b>	21
<b>3.5.6</b>	<b>ATIVIDADE DE ÁGUA</b>	22
<b>3.5.7</b>	<b>POLIFENÓIS TOTAIS</b>	22
3.6	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA O MEL DE APIS E PROPOSTAS DE LEGISLAÇÃO PARA O MEL DE MEL DE MELIPONÍNEOS	23
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	26
4.1	MATÉRIA PRIMA	26
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	26
4.3	PREPARO DO XAROPE PARA ALIMENTAÇÃO DAS ABELHAS	26
4.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	27
<b>4.4.1</b>	<b>ACIDEZ TOTAL</b>	27
<b>4.4.2</b>	<b>pH</b>	27
<b>4.4.3</b>	<b>AÇÚCARES</b>	28
4.4.3.1	AÇÚCARES REDUTORES	28
4.4.3.2	SACAROSE (AÇÚCARES NÃO REDUTORES)	28
4.4.3.3	AÇÚCARES TOTAIS	29
<b>4.4.4</b>	<b>SÓLIDOS SOLÚVEIS</b>	29
<b>4.4.5</b>	<b>UMIDADE</b>	30

<b>4.4.6</b>	<b>ATIVIDADE DE ÁGUA</b>	<b>30</b>
<b>4.4.7</b>	<b>POLIFENÓIS TOTAIS</b>	<b>31</b>
<b>4.4.8</b>	<b>ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS</b>	<b>31</b>
4.4.8.1	COLIFORMES	31
4.4.8.2	BOLORES E LEVEDURAS	32
4.4.8.3	CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>33</b>
5.1	ACIDEZ TOTAL E AÇÚCARES TOTAIS (AT)	33
5.2	PH E ATIVIDADE DE ÁGUA ( $A_w$ )	35
5.3	SÓLIDOS SOLÚVEIS (SS), UMIDADE E POLIFENÓIS TOTAIS (PT)	36
5.4	COMPARAÇÃO COM AS PROPOSTAS DE LEGISLAÇÃO PARA MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO	37
5.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	38
<b>5.5.1</b>	<b>COLIFORMES</b>	<b>38</b>
<b>5.5.2</b>	<b>BOLORES E LEVEDURAS</b>	<b>39</b>
<b>5.5.3</b>	<b>CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão ou meliponíneos, também conhecidas como abelhas indígenas ou abelhas nativas são assim conhecidas em virtude da criação realizada pelos indígenas por muitos séculos (RODRIGUES, 2005). Essas espécies de abelhas possuem o ferrão atrofiado o que as torna incapazes de ferroar (SILVEIRA et al. 2002). Apesar das abelhas sem ferrão não possuírem um ferrão funcional e serem incapazes de ferroar, elas possuem outras maneiras de se defender. Elas podem enroscar no cabelo, morder, depositar resina ou secreção ácida no predador, manter guardas permanentes.

Estão descritas no Brasil 244 espécies de abelhas sem ferrão válidas e cerca de 89 formas ainda não descritas, alocadas em 29 gêneros (PEDRO, 2014). A meliponicultura é uma atividade bastante difundida nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e assim como as abelhas com ferrão as abelhas nativas apresentam produtos e subprodutos, tais como, mel, própolis, pólen e geoprópolis, sendo economicamente valorizado somente o mel, por esse motivo e pela facilidade de manejo, a criação dessas abelhas vem crescendo ao longo dos anos.

O mel é uma substância produzida por abelhas melíferas, em especial as pertencentes ao gênero *Apis*, o mesmo se produz a partir do néctar das flores, e possui um alto valor nutricional (BERA e ALMEIDA- MURADIAN, 2007). Silva et al. 2006, complementaram que o mel é constituído de vários açúcares, havendo o predomínio de D-frutose e Dglicose, a cor do mel varia de quase incolor a marrom escuro, pode ser fluido, viscoso ou até mesmo sólido e seu sabor e aroma irão variar de acordo com a origem da planta.

Embora produzam em menor quantidade, quando comparado com as abelhas com ferrão, os meliponíneos fornecem um produto diferenciado do mel de *Apis*, apresenta maior doçura e aroma inigualáveis, possuindo consumidores distintos e dispostos a pagar altos preços pelo produto no mercado (CARVALHO et al. 2005).

Em nossa região amazônica há um grande potencial tanto para meliponicultura quanto para apicultura devido a grande diversidade de espécies que se pode encontrar. O mel ainda é o produto mais explorado por apicultores e meliponicultores, porém o mel de meliponíneos necessita de suporte tecnológico e científico para correta produção e comercialização que sigam padrões exigidos por uma legislação específica.

O mel de abelhas sem ferrão possui maior teor de umidade que as abelhas estrangeiras e por esse motivo podem fermentar com maior facilidade, o que faz com que haja uma estreita relação entre os microorganismos e as abelhas e conseqüentemente com o mel. Assim como

em muitos insetos, os microorganismos apresentam um importante papel na nutrição das abelhas e na proteção contra microorganismos prejudiciais. (GILLIAM et al. 1990; ANDERSON et al. 2011). Os principais microorganismos responsáveis pela fermentação do mel são as leveduras e bolores, alterando as características organolépticas e físico-químicas do mesmo.

As mudanças que ocorrem nas características do mel, ocasionadas pela ação de microorganismos, ainda não estão totalmente elucidadas, pois até agora há muitas discussões sobre o aspecto patogênico que esses seres causam, mas há indícios de que a fermentação causada por eles adicionam características importantes ao mel, como a conservação do mesmo e produção de substâncias antioxidantes.

No Brasil há um vasto conhecimento sobre a apicultura, onde se pode contar com legislações que estabelecem métodos bem definidos para análise e padrões de qualidade, por outro lado, para a meliponicultura não existem normas para o controle de qualidade que assegure aos produtos uma comercialização legal e aos consumidores a compra de produtos idôneos (SOUZA e BAZLEN, 1998). Na literatura existem poucos relatos das características físico-químicas do mel de abelha sem ferrão ao longo do tempo.

Para tanto, visando contribuir para o entendimento dos processos bioquímicos e biológicos que estão relacionados com o processo de armazenamento do mel, por abelhas sem ferrão, neste trabalho estudaram-se os efeitos da fermentação natural sobre as características físico-químicas do mel da abelha *Melipona flavolineata* (uruçu – amarela) – Belém PA, e além das análises físico-químicas, contou com análises microbiológicas e polifenóis totais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos que a fermentação natural causa às características físico-químicas do mel de abelha sem ferrão *Melipona flavolineata* ao longo do tempo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar análises físico-químicas e microbiológicas no mel no decorrer do tempo;
- ✓ Analisar os resultados obtidos frente à fermentação natural do mel.
- ✓ Comparar os resultados obtidos com as propostas de legislação para mel de ASF.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE ABELHAS SEM FERRÃO

As abelhas sem ferrão fazem parte da tribo Meliponini ou subtribo Meliponina que são representadas por centenas de espécies nas regiões tropical e subtropical do hemisfério sul (SILVEIRA et al. 2002). Na região amazônica são descritas mais de 140 espécies e atualmente existem 33 gêneros exclusivamente neotropicais, totalizando 619 espécies (MICHENER, 2000; CAMARGO, PEDRO, 2007).

A criação de abelhas da subtribo Melipona recebe o nome de meliponicultura. É uma atividade que pode ser integrada a plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto, podendo contribuir, através da polinização, com o aumento da produção agrícola e regeneração da vegetação natural (VENTURIERI et al. 2003).

Os meliponíneos são abelhas eussociais, o que significa que só podem viver em colônias, onde há sobreposição de gerações e divisão de trabalho entre as castas. Essas colônias são perenes e, geralmente, possuem apenas uma rainha fecundada. São extremamente diversas em morfologia, hábitos de nidificação, comportamento e ecologia. Dessa forma, existem desde abelhas minúsculas, até abelhas maiores que as abelhas com ferrão. As abelhas sem ferrão também apresentam algumas diferenças em relação às abelhas melíferas. A rainha mãe fica no ninho, enquanto quem parte com as operárias é uma rainha virgem. Esta rainha fará seu vôo nupcial para se acasalar e, logo após, se estabelecer no novo ninho. Entretanto, o contato entre a colônia filha e a colônia mãe permanece por aproximadamente 40 dias, e as operárias da colônia filha podem levar material de construção de ninho (cerume) da colônia mãe, durante este período.

Os meliponíneos são abelhas que necessitam de um manejo simples em relação às abelhas com ferrão devido serem menos agressivas ao homem e animais (NOGUEIRA-NETO 1997). A região Amazônica se destaca como grande berço para o sucesso da meliponicultura de mercado devido ao clima, às espécies existentes e a disponibilidade de recursos florais (VENTURIERI, 2005; VILLAS-BÔAS & MALASPINA, 2005). Apesar de as abelhas sem ferrão produzirem mel em menor quantidade, elas oferecem um produto que se diferencia do mel das abelhas africanizadas, principalmente no sabor característico e no aroma, podendo alcançar elevados preços no mercado (ALVES et al. 2005; CORTOPASSI-LAURINO, 2002; KERR, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Entre as diversas peculiaridades dos méis de meliponíneos, destacam-se sua maior acidez e maior quantidade de água. Outra característica importante a ser destacada é a forma de os meliponíneos armazenarem o mel em seu ninho. Pólen e mel são armazenados separadamente. Portanto, em uma colônia de abelhas sem ferrão, podemos encontrar dois tipos de potes de alimento: potes de pólen e potes de mel. O mel de meliponíneos diferencia-se do mel de *Apis* por diversos fatores, tais como: espécies colhidas (fontes vegetais), espécies de abelhas que produzem o mel, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel, natureza do solo e condições meteorológicas (CRANE, 1985; PAMPLONA, 1994). A cor varia do quase transparente ao âmbar escuro e o gosto e níveis de açúcar dependem da espécie, da época, da região e, principalmente, da florada (AZEREDO et al. 1999). Além dos açúcares em solução, o mel também contém ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, flavonóides, minerais e uma extensa variedade de compostos orgânicos, que contribuem para sua cor, odor e sabor (PAMPLONA, 1989).

Apesar da sua importância, a legislação brasileira que regulamenta a padronização do mel para fins de comercialização só atende às características do mel de *A. mellifera*, não contemplando o mel das abelhas nativas do País. Isso leva à necessidade de estudo dos diferentes méis destas abelhas, para sua padronização e elaboração de uma futura legislação brasileira específica (AMAVIDA, 2006; AZEREDO et al. 1999).

### 3.2 ABELHA SEM FERRÃO *Melipona flavolineata*

A abelha da espécie *Melipona flavolineata* não possui ferrão e é muito comum no nordeste paraense, onde é conhecida também por Uruçu-amarela, sendo preferida pelos agricultores para a criação racional, por ser considerada boa produtora de mel. Esta espécie possui sistema de criação bem desenvolvido e o número de criadores que adotam o sistema de caixas racionais tem aumentado ao longo dos anos. A referida espécie ocorre na porção oriental do Estado do Pará e parte nos Estados do Ceará, Maranhão e Tocantins (PEDRO, 2014). As abelhas operárias podem ser agressivas e as colônias possuem população média. O mel é saboroso, não apresentam hábitos sujos e pode ser criada com facilidade.

**Figura 1.** Rainha e operária de *Melipona flavolineata* (uruçu-amarela), no momento em que antecede a ovoposição.



### 3.3 FERMENTAÇÃO

A fermentação é um processo, com ausência de oxigênio, pelo qual bactérias e fungos transformam carboidratos em outras substâncias orgânicas as quais fornecem energia aos microorganismos. A fermentação pode ser alcoólica, onde os carboidratos são transformados em álcool; acética, em que o álcool é transformado em ácido acético; e láctica, na qual os carboidratos são transformados em ácido lático e outras substâncias.

A relação de bactérias, bolores e leveduras com as abelhas ainda não foi totalmente elucidada. Os malefícios e os benefícios que esses microorganismos causam às abelhas sem ferrão e aos seus produtos precisam ainda ser mais investigados, pois devido ao grande número de espécies de abelhas existentes não há como generalizar dados, visto que cada espécie possui sua particularidade. Há uma linha de pesquisa que discute o papel não patogênico dos microorganismos em colônias de abelhas sem ferrão, ou seja, que tem o foco nos benefícios que esses microorganismos podem causar às abelhas.

Alguns microorganismos como as leveduras podem crescer no mel por tolerar as condições ácidas e níveis altos de sacarose, enquanto que as leveduras osmofílicas crescem quando a pressão osmótica é alta, inclusive no mel maduro, fermentando-o facilmente. A fermentação do mel resulta no crescimento da levedura convertendo o açúcar em álcool, gás carbônico, ácidos orgânicos e outras combinações (SNOWDON, 1999). Em presença de oxigênio, o álcool pode ser convertido em ácido acético (PEREIRA et al. 2004).

As abelhas podem adicionar muitas enzimas ao mel, que são produzidas por suas glândulas (COSTA E CRUZ - LANDIM, 2005), mas os microorganismos que vivem em mel também podem secretar muitas enzimas proteolíticas, glicolíticas e lipolíticas, que irão converter, fermentar e/ou preservar o mel (GILLIAM et al. 1990). Há alguma evidência de que o mel de abelha sem ferrão pode fermentar naturalmente dentro dos potes fechados do mel. É muito comum ver espuma na superfície do mel dentro potes de mel (SOUZA et al. 2007; MENEZES, observações pessoais), indicando que as bolhas de gás estão escapando do mel, provavelmente da fermentação alcoólica

### 3.4 MICROBIOLOGIA DO MEL

Alguns microorganismos que se fazem presentes no mel natural, normalmente são provenientes do néctar de flores e do contato com as próprias abelhas. Os produtos que contém mel exigem, portanto, pasteurização ou adição de produtos químicos (KRELL, 1996; GONZÁLES, 2002). De acordo com Tysset e Rousseau (1981) as fontes secundárias de contaminação do mel como o homem, equipamentos, recipientes, vento, poeira, água, insetos e outros animais sejam provavelmente iguais a de outros alimentos.

Coliformes totais (CT), bolores e leveduras (BL) são indicativos de higiene associados à manipulação. Coliformes fecais (CF) são índices higiênico-sanitários por serem potencialmente causadores de enfermidades. Bolores podem produzir toxinas hepatotóxicas quando consumidas em longo prazo.

A quantidade de bactérias presentes no mel pode variar com o tipo de mel (néctar ou honeydew), tipo da amostra (mel verde ou maduro), tempo e colheita, armazenamento e técnica de análise utilizada (SNOWDON, 1999). A qualidade do mel não depende apenas das práticas higiênicas do produtor, mas também está relacionada com os hábitos higiênicos das abelhas, pois é conhecido que muitas espécies pousam em material fecal (NOGUEIRA-NETO, 1997).

De acordo com Cano et al. (1994) e Camargo et al. (2000) bactérias do gênero *Bacillus* são as bactérias mais comuns e presentes em colônias de abelhas sem ferrão. As fermentações acética e láctica, que ocorrem no mel, também são realizadas por estas bactérias. O aparecimento de bolhas ou espuma na superfície do mel indicam fermentação alcoólica que sob condições aeróbicas pode tornar-se acética, pois certas bactérias, geralmente as do gênero *Bacillus*, convertem álcool e oxigênio em ácido acético e água. (GILLIAM, 1979b). Quando há a produção de ácido láctico e água ocorreu fermentação láctica, a qual é geralmente

proporcionada por bactérias. Além da função aparente na digestão dos alimentos, de maneira que os torna menos suscetíveis a danos e proliferação de microrganismos, Yoshiyama e Kimura (2009) encontraram fortes evidências de que espécies de *Bacillus* também secretam antibióticos.

O mel é geralmente contaminado por microorganismos, sendo as leveduras osmofílicas, principalmente *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torula*, os predominantes (MIGDAL et al. 2000). Os gêneros *Candida* e *Starmerella* também ocorrem frequentemente no mel (CAMARGO et al. 1992; ROSA et al. 2003; TEIXEIRA et al. 2003). Assim como as bactérias, as leveduras também possuem uma importante relação com as colônias de meliponíneos, pois também secretam enzimas que ajudam a conservar os alimentos. O processo de fermentação alcoólica é também iniciado por leveduras.

Muitos fungos estão associados ao conteúdo intestinal das abelhas, colmeias e pasto apícola. Fungos, como *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium* e *Peyronelia* têm sido isoladas em fezes de larvas de abelhas e no mel (GILLIAM; PREST, 1987). O mel pode ser fermentando facilmente por microorganismos quando algumas condições lhes são favoráveis, tais como umidade elevada e pouca higiene no momento de manipulação.

### 3.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL

Neste trabalho os caracteres físico-químicos analisados foram:

#### 3.5.1 ACIDEZ

O ácido glicônico é o principal ácido encontrado no mel e está em equilíbrio na forma de glicono-lactona, que será liberado quando o mel se alcaliniza. A acidez total é resultante da hidrólise das glicolactonas (PASSAMANI, 2005). Existem outros ácidos que podem ser encontrados no mel, como o fórmico, acético, benzóico, butírico, cítrico, iso- valérico, láctico, maleico, málico, oxálico, fenilacético, propiônico, piroglutânico, succínico e valérico, e muitos desses ácidos são adicionados pelas próprias abelhas. A acidez é extremamente importante, pois influencia na viscosidade, na estabilidade do mel e na conservação, por inibir a ação de microrganismos e, também, por realçar seu sabor (MOURA, 2010).

### 3.5.2 PH

O pH determinado no mel refere-se aos íons hidrogênio presentes numa solução, podendo influenciar na formação de outros componentes, assim como na velocidade de produção do hidroximetilfurfural (HMF) (VIDAL; FREGOSI, 1984). O pH é influenciado pela origem botânica, concentração de diferentes ácidos, íons cálcio, sódio e potássio, bem como por outros constituintes das cinzas. Em geral todos os méis são ácidos e o pH para os méis brasileiros de *Apis mellifera* varia de 3,95 a 4,09, enquanto o de meliponíneos varia de 3,39 a 4,63 (CORTOPASSI-LAURINO E GELLI, 1991).

Evangelista-Rodrigues 2005 observou que houve diferença significativa entre os méis das espécies de abelhas africanizadas e nativas, mesmo quando produzidos na mesma localidade, fator que poderia ser explicado pelas substâncias mandibulares que são acrescidas ao néctar durante o transporte do mel até a colmeia.

Valores de pH abaixo de 4,5 geralmente restringem o crescimento de microorganismos mesófilos, ou seja, a microbiota patogênica é deterioradora, contribuindo assim para maior durabilidade do mel (SOUZA, B. *et al.*, 2004).

O pH é considerado um importante fator antimicrobiano, provendo maior estabilidade ao produto quanto ao desenvolvimento de microorganismos. Embora ainda exista uma discussão a este respeito é fácil compreender a sua relevância quando se considera que vários microorganismos patogênicos para os animais tem um pH ótimo para o seu crescimento na faixa de 7,2 a 7,4, embora algumas bactérias causadoras de enfermidades se desenvolva na faixa de 4,0 a 4,5 (NOGUEIRA-NETO, 1997). O desenvolvimento destes microorganismos, juntamente com conteúdo mineral, atividade enzimática e textura, podem levar a alteração de valores de pH (CAVIA *et al.* 2007).

### 3.5.3 AÇÚCARES

De modo geral, os açúcares são componentes predominantes no mel de abelhas sem ferrão, variando de 85 a 95%, em relação aos demais compostos, com percentual próximo aos 32% de glicose e 39% de frutose (SOUZA *et al.*, 2006). Estes açúcares estabelecem as características físico-químicas (viscosidade, cristalização e acidez) e sensoriais (aroma e doçura) marcantes no mel de meliponíneos (ALVES *et al.*, 2005).

Em méis de abelhas indígenas sem ferrão, esses valores são muito variados, dependendo da espécie e da flora que o originou. Para que ocorra a cristalização do mel, a

concentração de glicose deve estar acima de 30%. Açúcares não redutores, como a sacarose, que servem como parâmetros de pureza do mel, mas quando determinada em grande quantidade, pode caracterizar adulteração, tanto na alimentação das abelhas quanto na adição direta de sacarose no mel (BERA, 2004).

Os teores de frutose e glicose são extremamente importantes para o estabelecimento de uma série de características do mel. A glicose, por exemplo, é o monossacarídeo responsável pela granulação do mel. O maior problema resultante dessa precipitação de glicose é o aumento do teor de umidade da fase líquida, que permite que células de leveduras osmofílicas (microorganismos que se desenvolvem em condições desfavoráveis: atividade de água baixa e concentração de glicídios alta), que ocorrem naturalmente no mel, se multipliquem e provoquem a fermentação do produto (MOREIRA; DE MARIA, 2001).

#### **3.5.4 SÓLIDOS SOLÚVEIS**

Os sólidos solúveis no mel são definidos como a medida da concentração de sólidos dissolvidos em uma solução, como os açúcares e ácidos (COULTATE, 2004). Os valores para este parâmetro são altos, principalmente em mel, visto que este possui elevado valor de açúcares e acidez.

Sousa et al. (2010), em estudo de mel de abelhas mandaçaia detectaram 66 °Brix, e para mel de abelha tíuba detectaram 61 °Brix. Ressalta-se que a legislação não recomenda valores mínimos e/ou máximos para este parâmetro.

#### **3.5.5 UMIDADE**

De maneira geral, o mel das espécies de meliponíneos tem como principal característica a diferenciação nos teores de água (umidade), o que o torna menos viscoso que o mel das abelhas africanizadas (CAMPOS; MODESTA, 2000). Quanto à produção de mel por meliponíneos, existem méis que se aproximam dos de *A. mellifera* em conteúdo de água e em açúcares, o que tecnologicamente é muito importante. Quando a concentração de açúcares é elevada, há um menor número de moléculas de água disponíveis para o desenvolvimento de microorganismos, ficando estes inibidos, proporcionando um produto mais estável à degradação microbiológica (NOGUEIRA-NETO, 1997). A água presente no mel está diretamente relacionada com a origem floral, localização geográfica, condições climáticas (temperatura e umidade) e edáficas (solos), estação do ano, umidade original do néctar e grau

de maturação na colmeia (BIJLSMA et al. 2006; CARVALHO et al. 2003; GONZÁLEZ, 2002).

Os méis dos meliponíneos contêm até 36,4 % de água, o que em condições especiais de níveis elevados de umidade pode levar o mel a fermentar pela ação de leveduras osmofílicas (tolerantes ao açúcar) presentes também em sua composição. (GONZÁLEZ, 2002; CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, 1991; BIJLSMA et al. 2006). A maior possibilidade de fermentação do mel está ligada ao teor de umidade e à presença de leveduras que, ao encontrarem um meio propício, irão converter o açúcar presente em álcool. Para o mel in natura, a fermentação é um processo indesejável, uma vez que pode reduzir significativamente a vida útil do mesmo. Entretanto, quando essa fermentação é controlada e conduzida pela indução de leveduras selecionadas, pode-se obter um produto conhecido como hidromel (MATTIETTO et al. 2006).

### 3.5.6 ATIVIDADE DE ÁGUA

É a água que encontra-se disponível, neste caso no mel, e que pode ser utilizada por microorganismos resultando na fermentação do mesmo. Segundo Zamora & Chirife, 2005, o limite de atividade de água para o crescimento de leveduras que são encontradas naturalmente no mel está por volta de  $A_w = 0,61 - 0,62$ . Coultate, 2004 relaciona o desenvolvimento dos principais microorganismos com seus respectivos valores mínimos de atividade de água, segundo a tabela 1.

**Tabela 1** Valores mínimos de atividade de água para o desenvolvimento de microorganismos.

Microorganismo	Atividade de água ( $A_w$ )	Microorganismo	Atividade de água ( $A_w$ )
Bactérias comuns	0,91	Bactérias halofílicas	0,75
Leveduras comuns	0,88	Bolores xerofílicos	0,65
Bolores comuns	0,80	Leveduras osmofílicas	0,60

Fonte: COULTATE (2004)

### 3.5.7 POLIFENÓIS TOTAIS

Os compostos polifenólicos compreende um vasto grupo de substâncias que incluem família de compostos com estruturas diversas, desde algumas relativamente simples, como os

derivados de ácidos fenólicos aos de molécula polimérica de alto peso molecular como os taninos e as lignanas. Muitos compostos fenólicos têm a propriedade de captar radicais livres, o que confere ao mel atividade antioxidante que poderia estar relacionada com a prevenção de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Também apresentam atividade antiviral, antiinflamatória e antialérgica (BRAVO et al. 1994; MIDDLETON e KANDASWAMI, 1994; RHODES, 1994; ROBARDS et al. 1999; MARTÍN-CARRÓN, 2000; PAAR e BOLWELL, 2000).

A ação antioxidante dos polifenóis pode ser devido a uma combinação de várias etapas químicas, as quais incluem inibição enzimática, quelação metálica e doação de hidrogênio. As estruturas polifenólicas podem interagir fortemente com proteínas mediante seu anel benzênico hidrofóbico e o potencial do hidrogênio do grupo fenólico hidroxílico (PAAR e BOLWELL, 2000).

Segundo Amiot et al. (1989) os compostos fenólicos de méis podem ser divididos em três grupos: ácidos benzóicos e seus ésteres; ácidos cinâmicos e seus ésteres e flavonóides livres. A proporção desses três grupos varia enormemente nos méis conforme as origens florais. Os ácidos fenólicos são os derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico (MANACH et al. 2004). Os derivados do ácido benzóico, do ácido cinâmico e os flavonóides são considerados possíveis marcadores biológicos presentes nos méis monoflorais e/ou heteroflorais, e podem auxiliar na determinação da origem botânica e/ou geográfica dos produtos apícolas. Os ácidos fenólicos naturais têm a sua origem derivada da rota do ácido chiquímico. E este é o precursor de muitos constituintes químicos das plantas que contenham anel aromático em sua estrutura (LIANDA, 2009).

### 3.6 PROPOSTAS DE LEGISLAÇÃO PARA MEL DE MELIPONÍNEOS

Os padrões da legislação brasileira para mel são regulamentados pela Instrução Normativa 11, de 20 de outubro/2000 e contemplam apenas o mel de *Apis mellifera*, ainda não há regulamentações para o mel de meliponíneos, porém há algumas propostas de regulamentações para mel de abelhas sem ferrão. As tabelas 3 e 4 mostram as propostas de regulamentação para o mel de abelhas sem ferrão elaboradas por alguns autores.

Em relação aos parâmetros microbiológicos do mel a tabela 2 mostra o padrão da Resolução – RDC Nº 12, de 12 de janeiro de 2001, estabelecendo os requisitos mínimos de qualidade para melado, melaço, rapadura e similares.

**Tabela 2:** Padrão de qualidade de melado, melaço, rapadura e similares

Matéria-prima	Coliformes Fecais a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> /25g	Bolores e Leveduras
melado, melaço, rapadura e similares	10 <sup>2</sup>	Ausente	-----

Fonte: BRASIL, 2001.

**Tabela 3:** Padronização da Legislação Brasileira para mel de *Meliponíneo* – proposta por Villas-Bôas e Malaspina (2005) e Regulamento técnico de identidade e padrão para o mel das abelhas sem ferrão – proposta por Camargo et al. (2017)

Mel de Abelhas sem Ferrão		
	Villas-Bôas e Malaspina (2005)	Camargo, et al. (2017)
<b>Açúcar Redutor</b>	Mín. 50g/100g	Mín. 60 g/100g
<b>Sacarose</b>	Máx. 6g/100g	Máx. 6 g/100g
<b>Umidade</b>	Máx. 35g/100g	Máx. 40 g/100g
<b>Sólidos Insolúveis</b>	Máx. 0,4g/100g	Máx. 0,1 g/100g
<b>Resíduo Mineral Fixo</b>	Máx. 0,6g/100g	Máx. 0,6 g/100g
<b>Acidez</b>	Máx. de 85 meq/kg	Máx. 50 meq/kg
<b>pH</b>	-----	2,9 a 4,5
<b>Hidroximetilfurfural</b>	Máx. de 40 mg/kg	Máx. de 20 mg/kg
<b>Atividade de Água</b>	-----	0,52 a 0,80
<b>Atividade diastásica</b>	Mín. 3 DN	-----
<b>Cor</b>	Branco d'água a Âmbar escuro	-----
<b>Coliformes a 45°C</b>	-----	10 <sup>2</sup> NMP/g
<b>Bolores e Leveduras</b>	-----	10 <sup>4</sup> NMP/g
<b><i>Salmonella</i> em 25g</b>	-----	Ausência

Fonte: VILLAS-BÔAS e MALASPINA (2005); CAMARGO, et al. (2017)

Na tabela 3 estão apresentadas as propostas de regulamentação para mel de abelhas sem ferrão. Os autores Villas-Bôas e Malaspina, 2005 e Camargo, et al., 2017 realizaram levantamento bibliográfico de estudos científicos para estabelecerem suas propostas. Os valores estabelecidos pelos autores diferem nos parâmetros AR, umidade, SI, acidez e hidroximetilfurfural. Essas diferenças são explicadas pelo fato de que, do ano 2005 até 2017 novas pesquisas com mel de meliponíneos foram realizadas e publicadas o que contribuiu de

forma significativa para as mudanças apresentadas por Camargo et al., 2017. Pois ampliou os limites de alguns parâmetros como umidade e acidez, visto que o mel de abelhas sem ferrão possui alto teor de umidade e elevada acidez.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIA PRIMA

O mel de abelha utilizado para realização dos ensaios foi o da abelha *Melipona flavolineata* (uruçu – amarela) coletado de julho a agosto de 2016, proveniente da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) do Estado do Pará. As abelhas foram superalimentadas com xarope de água e açúcar 50% v/v. As abelhas começaram a ser alimentadas com o xarope no dia 24 de junho de 2016.

### 4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE MEL

As amostras de mel foram coletadas de 5 caixas racionais (denominadas 2, 3, 4, 5 e 6) através de pipetas descartáveis. Os potes com mel (potes de cerume produzidos pelas abelhas, dispostos nas 5 caixas racionais, para armazenamento do mel) foram abertos manualmente com o auxílio de um material pontiagudo esterilizado. As amostras de mel foram transferidas para recipientes plásticos esterilizados de 50 mL. Após a coleta das amostras, estas foram mantidas sob-refrigeração (aproximadamente 4°C) até o momento dos ensaios.

As análises foram executadas de acordo com a disponibilidade de mel, produzido pelas abelhas, disposta nos potes. Foram efetuadas seis coletas de mel, sendo a primeira realizada com 7 dias (a contar do dia em que se iniciou a alimentação artificial com o xarope), a segunda com 14 dias, a terceira com 21 dias, a quarta com 31 dias, a quinta com 35 dias e a sexta 45 dias, para acompanhar a fermentação do mel no decorrer deste período.

As análises realizaram-se da seguinte forma: as amostras das caixas 2 e 3 tiveram suas análises efetuadas nos tempos 7 dias, 21 dias, 35 dias e 45 dias; as amostras das caixas 4 e 5 tiveram suas análises efetuadas nos tempos 14 dias e 31 dias; E a amostra da caixa 6 teve suas análises efetuadas nos tempos 14 dias, 31 dias e 45 dias.

### 4.3 PREPARO DO XAROPE PARA ALIMENTAÇÃO DAS ABELHAS

O xarope foi elaborado com açúcar cristal, na proporção de 50%, batido no liquidificador e adicionado de anilina comestível verde para identificação do mel no momento da colheita e assim não misturar com o mel de outras fontes florais. As abelhas foram alimentadas artificialmente com o xarope de açúcar para que o mel produzido nas colônias

fosse proveniente da mesma fonte e todos armazenados no mesmo período, para que assim pudesse se conhecer a “idade” de cada mel.

#### 4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL

As análises de acidez total, pH e açúcares foram realizadas no Laboratório de Bebidas e Vinagre (LABEV – LANAGRO PA), as demais análises foram realizadas no laboratório de Engenharia de Alimentos da UFPA. Algumas análises foram realizadas em duplicatas outras em triplicatas e devido a pouca quantidade de amostra algumas não puderam ser repetidas.

##### 4.4.1 ACIDEZ TOTAL

A análise de acidez foi realizada de acordo com o método nº 962.19 da A.O.A.C (1998), na qual utiliza-se 5g da amostra na titulação com solução de NaOH 0,1N até atingir pH 8,3. Utilizou-se titulador potenciométrico modelo 848 Titrino Plus. Esta análise não pôde ser replicada devido a pouca quantidade de amostra.

##### **Cálculo:**

$$\text{Acidez (meq/kg)} = \frac{V \times f_c \times N}{A} \times 1000$$

Onde:

V: nº. de mL de solução de NaOH 0,1N gasto na titulação

Fc: fator da solução de NaOH

N: concentração da solução de NaOH

A: nº. de gramas da amostra

##### 4.4.2 PH

A leitura de pH foi realizada utilizando-se pHmetro digital METROHM, modelo 780, de acordo com a metodologia BRASIL (2000). Antes das leituras o pHmêtro foi calibrado com soluções tampão 4,0 e 7,0. Foram realizadas três leituras para cada amostra.

### 4.4.3 AÇÚCARES

#### 4.4.3.1 AÇÚCARES REDUTORES

Preparou-se uma solução de mel a 20 %, desta solução retirou-se uma alíquota de 2 mL a qual foi transferida para balão volumétrico de 100 mL que em seguida foi aferido com água destilada. Desta última solução foi retirada uma alíquota de 10 mL e transferida para enrlenmyer de 300 mL. Ao enrlenmyer adicionou-se 40 mL de água destilada, algumas pérolas de vidro e 20 mL da solução Soxhlet (Fehling A (34,65g de sulfato de cobre para preparo de 500ml de solução) + Fehling B (173g de sal de Rochelle (tartarato de sódio e potássio) + 125g de KOH em água até 500mL)). Esta solução foi titulada com solução alcoólica de glicose a 0,5%. Utilizou-se também na titulação o indicador azul de metileno a 1%. Prosseguiu-se a titulação de acordo com o método Eynon Lane (1986) adaptado.

O teor de açúcar redutor foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{ARG} = \frac{(\mathbf{b} - \mathbf{a}) \times 5 \times \mathbf{f}_1 \times \mathbf{f}_2}{10 \times \mathbf{V}}$$

Onde:

ARG: açúcares redutores em glicose g/100g

b: volume de glicose gasto no branco

a: volume de glicose gasto na amostra

f<sub>1</sub>: fator de diluição

f<sub>2</sub>: fator de conversão (Glicose: 1,0)

V: volume da amostra utilizado na titulação.

#### 4.4.3.2 SACAROSE (AÇÚCARES NÃO REDUTORES)

Preparou-se uma solução de mel a 20 %, desta solução retirou-se uma alíquota de 2 mL a qual foi transferida para balão volumétrico de 100 mL que em seguida foi aferido com água destilada. Desta última solução foi retirado 50 mL e transferiu-se para outro balão volumétrico de 100 mL, a este balão adicionou-se 1 mL de HCl concentrado, esta solução foi colocada em banho-maria por 15 minutos. Em seguida neutralizou-se a solução com NaOH 5N e aferiu-se o balão com água destilada. Retirou-se desta solução uma alíquota de 10 mL e transferiu-se para enrlenmyer de 300 mL. Ao enrlenmyer adicionou-se 40 mL de água

destilada, algumas pérolas de vidro e 20 mL da solução Soxhlet (Fehling A (34,65g de sulfato de cobre para preparo de 500ml de solução) + Fehling B (173g de sal de Rochelle (tartarato de sódio e potássio) + 125g de KOH em água até 500mL)). Esta solução foi titulada com solução alcoólica de glicose a 0,5%. Utilizou-se também na titulação o indicador azul de metileno a 1%. Prosseguiu-se a titulação de acordo com o método Brasil (1986) adaptado.

O teor de sacarose (açúcar não redutor) foi calculado pela seguinte equação:

$$\text{ANRS} = \left\{ \frac{(\mathbf{b} - \mathbf{a}) \times \mathbf{5} \times (\mathbf{f}_1 \times \mathbf{2})}{\mathbf{10} \times \mathbf{V}} - \mathbf{ARG} \right\} \times \mathbf{f}_2$$

Onde:

ANRS: Açúcares Não Redutores em Sacarose g/100g

b: volume de glicose gasto no branco

a: volume de glicose gasto na amostra

f<sub>1</sub>: fator de diluição

f<sub>2</sub>: fator de conversão (Sacarose: 0,96)

V: volume da amostra utilizado na titulação.

#### 4.4.3.3 AÇÚCARES TOTAIS

Para o cálculo dos açúcares totais somou-se o valor dos açúcares redutores em glicose (ARG) com o valor dos açúcares não redutores em sacarose (ANRS) através da fórmula:

$$\mathbf{AT} = \mathbf{ARG} + \mathbf{ANRS}$$

Onde:

AT: açúcares totais g/100g

ARG: açúcares redutores em glicose g/100g

ANRS: Açúcares Não Redutores em Sacarose g/100g

#### 4.4.4 SÓLIDOS SOLÚVEIS

O método utilizado foi por refratometria a 20°C. Onde 1 gota do mel foi colocada no prisma do refratômetro de bancada tipo Abbé SBA-9006B e feita a leitura, conforme recomendado pelo ministério da agricultura (BRASIL, 2000). Esta análise foi realizada em triplicata.

#### 4.4.5 UMIDADE

Foi determinada pelo método refratrométrico n° 969.38 b da A.O.A.C. (1997), através da conversão do índice de refração do mel em % de umidade com o auxílio da tabela de Chataway (tabela 5). Para cada grau (°C) acima de 20°C foi adicionado 0,00023 ao índice de refração lido e então, obtido o valor de umidade em %. As leituras foram realizadas em triplicata.

**Tabela 4** – Relação entre o Índice de Refração (IR) e a porcentagem de água dos méis.

IR a 20°C	Umidade %	IR a 20°C	Umidade %	IR a 20°C	Umidade %	IR a 20°C	Umidade %
1,5044	13,0	1,4961	16,2	1,4880	19,4	1,4800	22,6
1,5038	13,2	1,4956	16,4	1,4875	19,6	1,4795	22,8
1,5033	13,4	1,4951	16,6	1,4870	19,8	1,4790	23,0
1,5028	13,6	1,4946	16,8	1,4865	20,0	1,4785	23,2
1,5023	13,8	1,4940	17,0	1,4860	20,2	1,4780	23,4
1,5018	14,0	1,4935	17,2	1,4855	20,4	1,4775	23,6
1,5012	14,2	1,4930	17,4	1,4850	20,6	1,4770	23,8
1,5007	14,4	1,4925	17,6	1,4845	20,8	1,4765	24,0
1,5002	14,6	1,4920	17,8	1,4840	21,0	1,4760	24,2
1,4997	14,8	1,4915	18,0	1,4835	21,2	1,4755	24,4
1,4992	15,0	1,4910	18,2	1,4830	21,4	1,4750	24,6
1,4987	15,2	1,4905	18,4	1,4825	21,6	1,4745	24,8
1,4982	15,4	1,4900	18,6	1,4820	21,8	1,4740	25,0
1,4976	15,6	1,4895	18,8	1,4815	22,0	-	-
1,4971	15,8	1,4890	19,0	1,4810	22,2	-	-
1,4966	16,0	1,4885	19,2	1,4805	22,4	-	-

FONTE: Instituto Adolfo Lutz, 2008

#### 4.4.6 ATIVIDADE DE ÁGUA

A leitura da atividade de água ( $A_w$ ) foi efetuada em medidor com modelo AQUALAB 4TEV (por ponto de orvalho), utilizando-se padrões 0,76 e 0,25 respectivamente. As amostras estavam a 25°C. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.4.7 POLIFENÓIS TOTAIS

A concentração dos fenóis totais nos méis foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito previamente na literatura (MEDA et al., 2005) utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu. Foram efetuados três ensaios para cada amostra, sendo apresentada a média, expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) /100 g de mel. Solubilizou-se 100 mg do mel em 1 mL de água destilada. A uma alíquota de 0,5 mL dessa solução adicionou-se 2,5 mL de Reagente de Folin-Ciocalteu, após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 4%. Manteve-se a mistura incubada por 2h. Em seguida, fez-se a medida de sua absorvância a 760 nm (em temperatura ambiente), em espectrofotômetro (Evolution 300 UV-VIS, Thermo Scientific).

O branco utilizado foi preparado com 0,5 mL de etanol absoluto P.A; 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 2 mL de carbonato de sódio. Os teores dos compostos fenólicos foram calculados construindo-se uma curva padrão de calibração do ácido gálico, contendo: 10; 25; 40; 70; 85 e 100 ppm desse mesmo ácido dissolvido em álcool etílico absoluto.

#### 4.4.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises de Bolores e Leveduras, Coliformes e contagem de bactérias, foram realizadas segundo a metodologia de Vanderzant e Splittstoesser (1992). Os resultados foram analisados segundo Brasil (2001).

##### 4.4.8.1 COLIFORMES

Pesou-se 25 g de amostra de mel e adicionou-se 225 mL de peptona simples, obtendo-se uma diluição inicial de  $10^{-1}$ , a partir dessa diluição foram preparadas diluições decimais até  $10^{-3}$ . A determinação de coliformes foi realizada pelo método de fermentação em tubos múltiplos, utilizando série de três tubos nos procedimentos e caldo Lauril Sulfato Triptona (CLST). Os inóculos foram incubados a 36°C por 24 horas. A partir dos tubos com resultados positivos, foram inoculados em tubos contendo caldo E.C e incubados a 45°C, em banho-maria por 24 horas. A determinação do NMP de coliformes foi empregando-se a Tabela para Número Mais Provável (NMP).

#### 4.4.8.2 BOLORES E LEVEDURAS

Foi pesado 25g de amostra de mel e adicionado em 225 mL de peptona simples, obtendo-se assim uma diluição inicial de  $10^{-1}$  e a partir dessa diluição foram preparadas diluições decimais até  $10^{-3}$ . A contagem de bolores e leveduras foi realizada pela técnica de semeadura em superfície, utilizando-se Potato Dextrose Agar para contagem adicionado de de ácido tartárico a 10% e incubado por 5 dias a 22°C.

#### 4.4.8.3 CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS

Homogeneizou-se 25g de amostra de mel em 225 mL de APA (diluição  $10^{-1}$ ), a partir dessa diluição foram preparadas diluições decimais até  $10^{-3}$ . Para o plaqueamento foi adicionado 1mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas, em seguida adicionou-se 15mL de Agar para contagem padrão em placa (Plate Count Agar – PCA), após solubilização do ágar as placas foram incubadas em posição invertida a 35°C por 48 h.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 5 mostra os resultados das análises do xarope puro, antes das abelhas armazenarem.

**Tabela 5** – Resultado das análises do xarope puro

<b>Acidez</b>	2,36 meq/Kg	<b>Umidade</b>	48,40 %
<b>pH</b>	4,90	<b>Atividade de água</b>	0,94
<b>Açúcares Redutores</b>	2,50 g/100g	<b>Polifenóis Totais</b>	6,69 mgEAG/100g
<b>Sacarose</b>	40,80 g/100g	<b>Coliformes</b>	150 NMP/g
<b>Açúcares Totais</b>	43,30 g/100g	<b>Bolores e Leveduras</b>	2,70 x 10 <sup>4</sup>
<b>Sólidos Solúveis</b>	47,90 %	<b>Contagem de Bactérias</b>	1,30 x 10 <sup>4</sup>

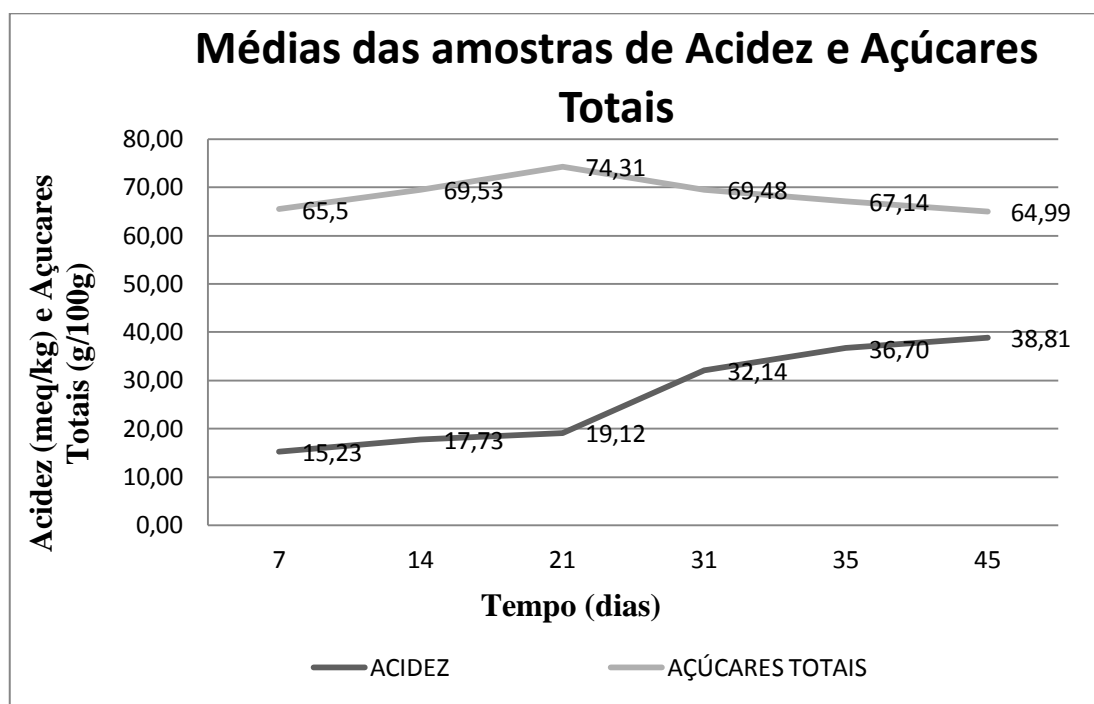
FONTE: Elaborado pela autora.

O xarope para alimentação das abelhas apresentou acidez baixa e pH próximo de 5, pH que é muito suscetível a predominância de crescimento bacteriano, assim como a elevada umidade e atividade de água apresentadas. Os açúcares e os sólidos solúveis chegam muito próximos à quantidade de açúcar utilizado na preparação do xarope (50%), o que mostra que o açúcar utilizado não é totalmente puro. O teor de polifenóis encontrado indica uma pequena quantidade destes presentes no xarope. E as análises microbiológicas indicam alta contaminação por bactérias, bolores e leveduras, que provavelmente estão presentes pela pouca higienização dos materiais utilizados no preparo do xarope.

### 5.1 ACIDEZ TOTAL E AÇÚCARES TOTAIS (AT)

O gráfico 1 exibe os resultados das médias de acidez e açúcares totais nas amostras ao longo do tempo.

**Gráfico 1** – Médias dos teores de acidez (meq/kg) e açúcares totais (g/100g) em amostras de méis “in natura” de *M. flavolineata*



FONTE: Elaborado pela autora.

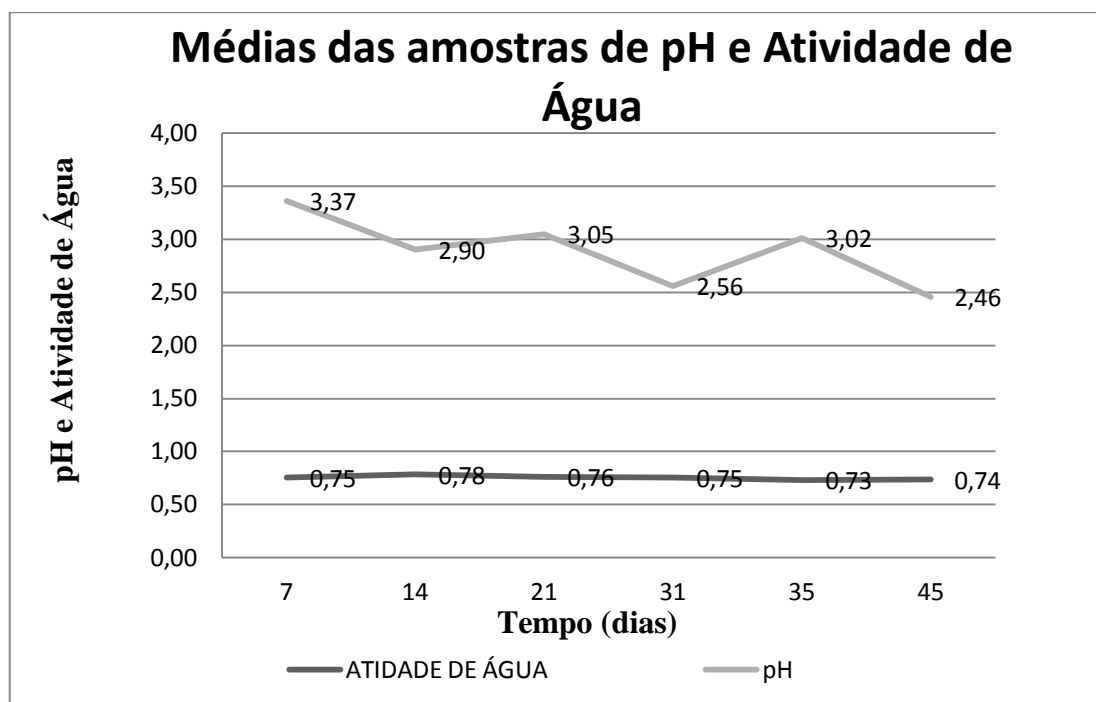
Observando os dados dispostos no gráfico acima, todas as amostras tiveram sua acidez aumentada com o decorrer do tempo. Analisando individualmente os resultados das amostras, o valor mínimo de acidez encontrada foi de 13,19 meq/kg (no tempo 7 dias) e o máximo foi de 52,11 meq/kg (no tempo de 45 dias). O aumento da acidez ao longo do tempo pode estar relacionado às quantidades de ácidos orgânicos provenientes pelas diferentes fontes de néctar, pela ação da enzima glicose-oxidase, a mesma possui atividade máxima em méis mais diluídos, produzindo níveis elevados de ácido glucônico e pela ação de bactérias durante a maturação do mel, as mesmas degradam carboidratos e promovem a formação de ácidos (NOGUEIRA-NETO, 1997; RODRIGUES-EVANGELISTA, SILVA, BESERRA, 2003; MORAES et al. 2005).

Ainda observando-se o gráfico 1, apesar de na segunda análise as amostras 2, 3 e 6 terem aumentado, todas as amostras tiveram seu teor de açúcar total diminuído ao longo do tempo indicando a fermentação do mel (Pérez-Pérez et al. 2007). Pois os microorganismos convertem os açúcares em outras substâncias, o que explica o fato do seu decréscimo. Souza et al. 2009, verificaram, em méis de meliponíneos da região Nordeste, valores médios de açúcares totais entre 57,9 a 95,6%. Já em méis produzidos na região Amazônica, Souza et al. 2004, verificaram para açúcares totais valores de 60,2 a 61,7%.

## 5.2 pH E ATIVIDADE DE ÁGUA ( $A_w$ )

O gráfico a seguir mostra os resultados das médias de pH e atividade de água obtidos nas amostras no decorrer do tempo.

**Gráfico 2** – Médias dos teores de pH e atividade de água em amostras méis “in natura” de *M. flavolineata*



FONTE: Elaborado pela autora.

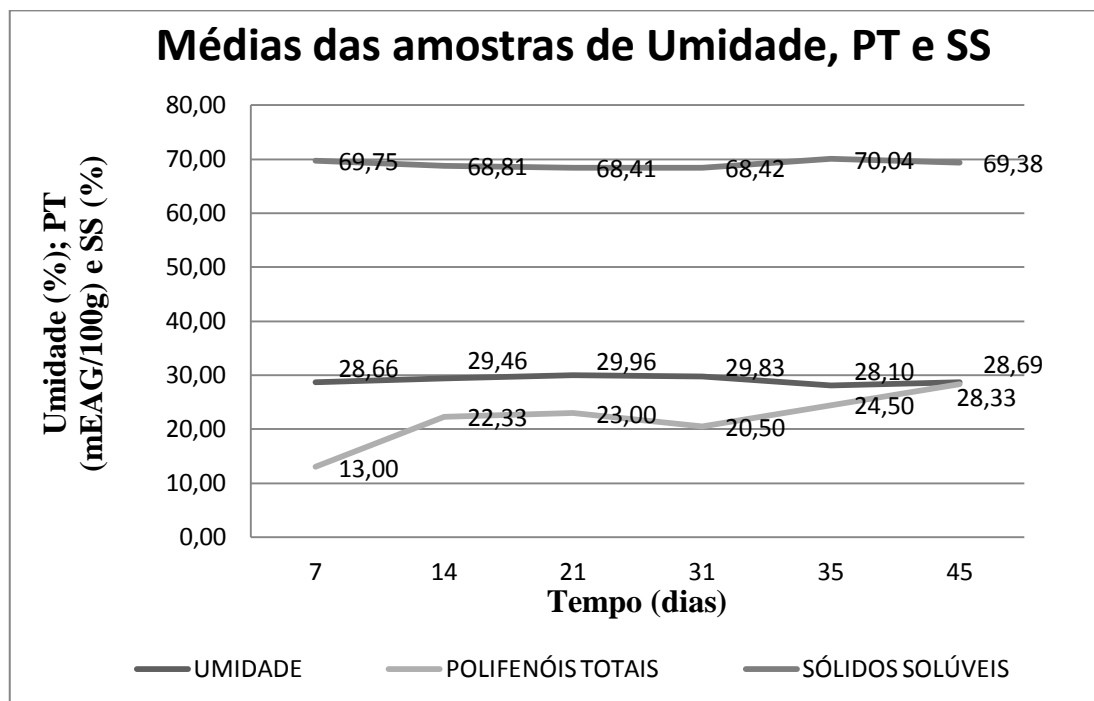
Observando-se o gráfico 2, todas as amostras tenderam a ter seu pH diminuído ao longo do tempo. Analisando individualmente os resultados das amostras, o valor máximo encontrado foi de 3,48 (no tempo 7 dias) e o mínimo foi de 1,53 (no tempo 45 dias). Cortopassi-Laurino e Gelli, 1991, encontraram valores entre 3,39 e 4,63. Camargo, 2017, após revisão bibliográfica estabeleceu valores entre 2,9 e 4,5. O aumento da acidez confirma os resultados do pH. A redução do pH de um alimento contribui para reduzir a capacidade de desenvolvimento microbiano, porém em alimentos com pH abaixo de 4.0 (alimentos muito ácidos) ainda há a possibilidade do surgimento de leveduras e bolores que conseguem sobreviver em ambientes muito ácidos e bactérias acéticas, e *Zymomonas*. O valor do pH pode ainda ser influenciado pela concentração de diferentes ácidos, do cálcio, sódio, potássio e outros constituintes das cinzas (SEEMANN e NEIRA, 1988).

Ainda analisando-se o gráfico 2, apesar do ligeiro decréscimo, não observou-se modificações significativas de  $A_w$ . Apenas as amostras 4 e 6 tiveram atividade de água ligeiramente aumentada. Os valores variaram de 0,72 a 0,80  $A_w$ , o que segundo Coultate (2004) indica a presença de bactérias halofílicas e bolores comuns.

### 5.3 SÓLIDOS SOLÚVEIS (SS), UMIDADE E POLIFENÓIS TOTAIS (PT)

No gráfico a seguir estão apresentados os resultados das médias dos sólidos solúveis, umidade e polifenóis totais ao longo do tempo.

**Gráfico 3** – Médias dos teores de sólidos solúveis, umidade e polifenóis totais em amostras de méis “in natura” de *M.flavolineata*



FONTE: Elaborado pela autora.

Como pode ser observado no gráfico 3, ao longo dos 45 dias, a amostra que apresentou menor variação no teor de sólidos solúveis foi a amostra 2. Analisando individualmente os resultados das amostras, o menor teor foi de 64,20 % e o maior teor foi de 73,20 %. Observando-se as médias entre as amostras, o conteúdo de sólidos solúveis obteve pouca variação no decorrer do tempo, mas pôde-se notar um pequeno aumento e, apesar dos açúcares terem diminuído o aumento dos sólidos solúveis é explicado pelo aumento da acidez e dos compostos fenólicos, como pode-se observar nos resultados de polifenóis totais.

Analisando individualmente os resultados das amostras, os teores de umidade encontrados variaram de 25,28 % a 33,90 %. O alto valor de umidade se dá, em méis meliponíneos, por suas características diferenciadas como viscosidade e fluidez. Tomando-se como referência a média final entre as amostras, no decorrer do tempo a umidade no mel sofreu pouca variação, como pode ser observado no gráfico 3. Analisando as amostras individualmente, com exceção da amostra 3, todas as amostras tiveram sua umidade aumentada. O aumento da umidade justifica o decréscimo dos açúcares totais e reafirma a fermentação no mel, pois certos microrganismos osmofílicos (tolerantes ao açúcar) quando presentes no mel multiplicam-se com o aumento da umidade, favorecendo o seu processo de fermentação. Estes microrganismos estão presentes nos corpos das abelhas, no néctar, no solo, nas áreas de extração e armazenamento do mel (WHITE JÚNIOR, 1978).

Cortopassi-Laurino e Gelli, 1991, ao analisarem amostras de méis de diferentes espécies de abelhas nativas apontaram valores entre 18 e 36%. Souza et al. (2006a), também com diferentes espécies de meliponíneos, constataram variação entre 19,9 e 41,9% de umidade. Portanto, os valores obtidos neste estudo estão próximos aos valores geralmente encontrados para méis de abelhas sem ferrão. Por apresentarem valores maiores que do que abrange a tabela de Chataway, esta, geralmente, tem que ser expandida para que se obtenha a umidade correspondente ao índice de refração encontrado.

Ainda observando-se o gráfico 3, as amostras tenderam a ter seus teores de fenólicos totais aumentados ao longo do tempo. O aumento do teor de polifenóis totais explica o acréscimo de sólidos solúveis. Os valores de fenólicos totais obtidos nas últimas análises deste trabalho aproximam-se dos valores encontrados por Oliveira et al. (2012), que para mel de *M. flavolineata* do município de Tracuateua encontraram valor de 26,39 mgEAG/100g.

#### 5.4 COMPARAÇÃO COM AS PROPOSTAS DE LEGISLAÇÃO PARA MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO

Apenas os resultados das análises de acidez, pH, açúcares, umidade, atividade de água, coliformes e bolores e leveduras, obtidos neste trabalho, puderam ser comparados com as propostas de regulamentação para mel de abelhas sem ferrão.

**Tabela 6** – Comparação entre os resultados obtidos neste trabalho com as propostas de legislação para mel de abelhas sem ferrão

	Villas-Bôas e Malaspina (2005)	Camargo, et al. (2017)	Médias dos resultados obtidos neste trabalho (T = 45 dias)
<b>Umidade</b>	Máx. 35g/100g	Máx. 40 g/100g	28,69 g/100g
<b>Acidez</b>	Máx. de 85 meq/kg	Máx. 50 meq/kg	38,81 meq/kg
<b>pH</b>	-----	2,9 a 4,5	2,46
<b>AT (Açúcar Redutor + Sacarose)</b>	56 g/100g	66 g/100g	64,99 g/100g
<b>Atividade de Água</b>	-----	0,52 a 0,80	0,74
<b>Coliformes a 45°C</b>	-----	10 <sup>2</sup> NMP/g	<3 NMP/g
<b>Bolores e Leveduras</b>	-----	10 <sup>4</sup> NMP/g	7,00 x 10 NMP/g

FONTE: Villas-Bôas e Malaspina (2005); Camargo, et al. (2017); Autora deste trabalho

Em relação aos parâmetros citados, ao analisar as médias dos resultados, todas as amostras no tempo de 45 dias estão de acordo com Camargo et al., 2017, como mostra a tabela 6. E apenas acidez e umidade, em todos os tempos, estão de acordo com Villas-Bôas e Malaspina, 2005. No gráfico acima, que mostra as médias de acidez e açúcares ao longo do tempo, pode-se observar o aumento dos açúcares e o decréscimo da acidez, com destaque para os últimos pontos que estão de acordo com Camargo et al., 2017. Por tanto com o tempo de 45 dias o mel de *M. flavolineata* se enquadra dentro dos padrões.

## 5.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

### 5.5.1 COLIFORMES

Na tabela 7 estão apresentados os resultados das análises de coliformes nas amostras ao longo do tempo.

**Tabela 7** – Resultados das análises de Coliformes em amostras de méis “in natura” de *M. flavolineata* (NMP/g)

	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4	AMOSTRA 5	AMOSTRA 6	MÉDIA
<b>TEMPO 7 DIAS</b>	< 3	< 3	*	*	*	< 3
<b>TEMPO 14 DIAS</b>	*	*	< 3	< 3	< 3	< 3
<b>TEMPO 21 DIAS</b>	< 3	< 3	*	*	*	< 3
<b>TEMPO 31 DIAS</b>	*	*	*	< 3	< 3	< 3
<b>TEMPO 35 DIAS</b>	< 3	< 3	*	*	*	< 3
<b>TEMPO 45 DIAS</b>	< 3	< 3	*	*	< 3	< 3

FONTE: Elaborado pela autora.

Nota: \*Não havia amostra suficiente para realizar a análise.

Segundo Brasil (2001), o padrão de coliformes para melado, melaço, rapadura e similares é de  $10^2$  NMP/g, assim como a proposta feita por Camargo et al. (2017) para mel *Meliponíneo*. Analisando a tabela 7 todas as amostras apresentaram resultado negativo (<3 NMP/g), ou seja, não apresentaram bactérias do grupo coliforme. Oliveira et al. (2005) analisando amostras de méis de abelhas sem ferrão não constatou presença de coliformes. Anacleto, 2007 analisando amostras de méis de *T. angustula* também encontrou resultado negativo de coliformes para maioria das amostras.

### 5.5.2 BOLORES E LEVEDURAS

Os resultados de bolores e leveduras podem ser observados na tabela a seguir.

**Tabela 8** – Resultados das análise de Bolores e Leveduras em amostras de méis “in natura” de *M. flavolineata* (UFC/g)

	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4	AMOSTRA 5	AMOSTRA 6	MÉDIA
<b>TEMPO 7 DIAS</b>	8,40 x 10 <sup>4</sup>	1,37x 10 <sup>5</sup>	*	*	*	<b>1,10 x 10<sup>5</sup></b>
<b>TEMPO 14 DIAS</b>	*	*	5,40 x 10 <sup>3</sup>	1,14 x 10 <sup>4</sup>	5,80 x 10 <sup>4</sup>	<b>2,49 x 10<sup>2</sup></b>
<b>TEMPO 21 DIAS</b>	4,50 x 10 <sup>2</sup>	3,60 x 10 <sup>2</sup>	*	*	*	<b>4,05 x 10<sup>2</sup></b>
<b>TEMPO 31 DIAS</b>	*	*	*	9,00 x 10	4,10 x 10 <sup>2</sup>	<b>2,50 x 10<sup>2</sup></b>
<b>TEMPO 35 DIAS</b>	8,00 x 10 <sup>2</sup>	4,00 x 10 <sup>2</sup>	*	*	*	<b>6,00 x 10<sup>2</sup></b>
<b>TEMPO 45 DIAS</b>	0,00	6,00 x 10	*	*	1,50 x 10 <sup>2</sup>	<b>7,00 x 10</b>

FONTE: Elaborado pela autora.

Nota: \*Não havia amostra suficiente para realizar a análise.

Analisando-se a tabela 8 os valores variaram de 0 a 1,37 x 10<sup>5</sup> UFC/g. Ao longo do tempo as unidades formadoras de colônias diminuíram, estes resultados mostram que a fermentação está cessando devido as condições inapropriadas para estes microorganismos, pois a análise de pH revelou que no decorrer do tempo seu valor diminui deixando o mel com acidez muito elevada. Devido a altas concentrações de açúcares as leveduras mais prováveis no mel são as osmofílicas que são tolerantes ao açúcar (MIGDAL et al. 2000).

### 5.5.3 CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS

A legislação brasileira não estabelece um padrão para contagem de bactérias em méis e também não há proposta para tal parâmetro em mel *Meliponíneos*.

Os resultados das análises de contagem padrão de bactérias podem ser observados na tabela a seguir.

**Tabela 9** – Resultado das análises de Contagem Padrão de Bactérias em amostras de méis “in natura” de *M. flavolineata* (UFC/g)

	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4	AMOSTRA 5	AMOSTRA 6	MÉDIA
<b>TEMPO 7 DIAS</b>	INC	$1,13 \times 10^4$	*	*	*	<b><math>1,13 \times 10^4</math></b>
<b>TEMPO 14 DIAS</b>	*	*	$5,80 \times 10^2$	$5,90 \times 10^2$	$3,80 \times 10^2$	<b><math>5,16 \times 10^2</math></b>
<b>TEMPO 21 DIAS</b>	$7,00 \times 10$	$1,80 \times 10^2$	*	*	*	<b><math>1,25 \times 10^2</math></b>
<b>TEMPO 31 DIAS</b>	*	*	*	$3,20 \times 10^2$	$1,80 \times 10^2$	<b><math>2,50 \times 10^2</math></b>
<b>TEMPO 35 DIAS</b>	$3,10 \times 10^3$	$5,10 \times 10^2$	*	*	*	<b><math>1,80 \times 10^3</math></b>
<b>TEMPO 45 DIAS</b>	$1,08 \times 10^3$	$3,20 \times 10^2$	*	*	$2,30 \times 10^2$	<b><math>5,43 \times 10^2</math></b>

FONTE: Elaborado pela autora.

Nota: \*Não havia amostra suficiente para realizar a análise.

Analisando a tabela 9 todas as amostras apresentam alto número de colônias, mas, observando-se a média entre as amostras, há uma tendência a diminuir no tempo de 45 dias, o que indica que a fermentação está cessando. As bactérias mais geralmente encontradas em colônias de abelhas sem ferrão são as do gênero *Bacillus* que provocam fermentação acética e láctica (CANO et al., 1994; CAMARGO et al., 2000). A qualidade do mel não depende apenas das práticas higiênicas do produtor, mas também está relacionada com os hábitos higiênicos das abelhas, pois é conhecido que muitas espécies pousam em material fecal (NOGUEIRA-NETO, 1997).

## **6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS**

- ✓ O xarope utilizado para alimentação das abelhas apresentou alta elevada contaminação por bactérias e bolores e leveduras. Por tanto, para trabalhos futuros seria importante realizar a pasteurização do xarope para assim evidenciar que os microorganismos encontrados no mel ocorrem de forma natural.
- ✓ Tentar isolar os grupos de microrganismos presentes no mel e/ou nas caixas, a fim de elucidar o processo de maturação que ocorre nos potes de armazenamento.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados das análises do xarope puro utilizado para alimentação das abelhas mostram que, o xarope estava propício à fermentação devido à alta umidade e baixa acidez (sugere-se para trabalhos futuros pasteurização do xarope) e as abelhas aceitaram facilmente esta alimentação artificial.

A fermentação no mel foi comprovada pela diminuição dos açúcares totais e pelo alto conteúdo de umidade que proporciona fermentação espontânea do mel através de leveduras que encontram ambiente favorável. Ao longo dos 45 dias o processo de fermentação ocasionou o aumento da acidez total no mel de *M. flavolineata* e conseqüentemente o pH diminuiu, pois microorganismos atuam durante a maturação do mel degradando carboidratos e promovendo a formação de ácidos. Alimentos com pH abaixo de 4,0 estão propícios ao surgimento de leveduras e bolores que suportam ambientes super ácidos.

Apesar do ligeiro decréscimo, não observou-se variações significativas nos valores de atividade de água ao longo do tempo. O conteúdo de sólidos solúveis apresentou pouca variação no decorrer do tempo, mas notou-se um pequeno aumento que pode ser explicado pelo aumento de compostos fenólicos, pois através da fermentação as bactérias promovem a formação de ácidos que dão origem a compostos fenólicos.

Ao longo dos 45 dias todas as amostras apresentaram resultado negativo para presença de bactérias do grupo coliformes. Para bolores e leveduras as unidades formadoras de colônias por grama de mel apresentaram tendência a diminuir nas últimas análises das amostras, assim como as unidades formadoras de colônias por grama de mel na contagem padrão de bactérias, o que indica que a fermentação está cessando devido as condições inapropriadas para estes microorganismos, pois no decorrer dos 45 dias os valores de pH diminuíram deixando o mel com acidez elevada.

Apesar de há muito associarmos somente características patogênicas à relação dos microorganismos com o mel, existem fortes indícios de que microorganismos possuem funções importantes como a segregação de enzimas (que convertem substâncias dos alimentos armazenados no mel e ajudam a conserva-los) que causam fermentação e que auxiliam na pré-digestão dos alimentos das abelhas. As bactérias que ocasionam fermentação acética e láctica no mel também secretam antibióticos.

Por tanto, a fermentação natural no mel de *M. flavolineata* pode acrescentar substâncias benéficas e importantes ao mel como conservação do mesmo devido a elevada

acidez que evita o surgimento de microorganismos patogênicos e produção de substâncias antioxidantes que combatem radicais livres e previnem alguns tipos de cânceres.

## REFERÊNCIAS

ALVES, R. M. O. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (HYMENOPTERA: APIDAE). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas, v. 25 n. 4, p. 644-650. 2005.

AMAVIDA. Mel de abelhas nativas no mercado. Disponível em: <<http://www.amavida.org.br/index.php>>. Acesso em: 13 junho, 2016.

AMIOT, M.J. et al. The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification. **Apidologie**, v. 20 n. 2, p. 115-125. 1989.

ANACLETO, D. A. Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo. **Tese de doutorado em ciências**. Piracicaba, 133p. 2007.

ANDERSON, K. E. et al. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**. v. 58. 431-444p. 2011.

AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. da C.; DAMASCENO, J. G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis - RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 19. nº 1. 3-7p. 1999.

BERA, A. Composição físico-química e nutricional do mel adicionado com própolis. USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. **Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos: Área de Bromatologia**. São Paulo, 68 p. 2004.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. de. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciências Tecnologia Alimentos**. Campinas, v. 27, nº 1, 49-52 p. 2007.

BIJLSMA, L. et al. Water content of stingless bee honeys (*Apidae, Meliponini*) interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**. v. 37. 480-486p. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 28 nov. Seção 1, PT. 2. 1986.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 30.691 de 08 de setembro de 1997. **Diário Oficial**, de 08 de setembro de 1997. Seção 1, p. 19696-19697. Aprova as normas do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 out. 2000, seção 1, p. 23. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1690>> Acesso em: 13 de Junho 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC, nº12, de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial** da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRAVO, L.; ABIA, R. Y.; SAURA-CALIXTO, F. Polyphenols as dietary fiber associated compounds comparative study on im vitro properties. **J. Agric. Food Chem.** v. 42, 1481-1487 p. 1994.

CAMARGO, J. M. F. et al. Notas previas sobre a bionomia de *Ptilotrigona lurida* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae): associação de leveduras em pólen estocado. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi.** v.8, 391–395p. 1992.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S., URBAN, D.; MELO, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region.** Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 272- 577 p. 2007.

CAMARGO, R. C. R. et al. Mel de Abelhas Sem Ferrão: Proposta de Regulamentação. **Brazilian Journal of Food Technology.** Campinas, v. 20, e2016157, 2017.

CAMARGO, J. M. F.; GRIMALDI, D.; PEDRO, S. R. M. The extinct fauna of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in Dominican amber: two new species and redescription of the male of *Proplebeia dominicana* (Wille and Chandler). **American Museum Novitates** v. 3293, 1–24p. 2000.

CANO, R. J. et al. *Bacillus* DNA in fossil bees: an ancient symbiosis? **Applied and Environmental Microbiology** 60:2164–2167. 1994.

CAMPOS, G.; MODESTA, R. C. D. Diferenças sensoriais entre mel floral e mel de melato. **Revista do Instituto Adolfo Lutz.** v. 59, n. 1-2, 7-14p. 2000.

CARVALHO, C. A L. de; ALVES, R. M. de O.; SOUZA, B. de A. Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia; **SEAGRI.** (Série Meliponicultura, 01) 42 p. 2003.

CARVALHO, C. A. L. et al. Mel de abelha sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia. **SEAGRI-BA.** 32 p. 2005.

CAVIA, M. M. et al. Evolution of Acidity of Honeys from Continental Climates: Influence of induced granulation. **Food Chemistry,** London, v. 100, 1728-1733 p. 2007.

COULTATE, T. P. Alimentos: a química de seus componentes. 3ed porto Alegre: **Artmed,** 339p. 2004.

CORTOPASSI-LAURINO, M. Abelhas em agronegócios. **VI Seminário Nordestino de Pecuária - Apicultura,** Fortaleza,CE, 5-11p. 2002.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d' abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. **Apidologie,** Celle, v. 32, p. 61-73. 1991.

COSTA, C. C. da; PEREIRA, R. G.; PRATA-FILHO, D. A. The influence of the centrifuge on honey processing. **Eng. Agríc.**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 809-816. 2005.

COSTA, R. A. C.; CRUZ-LANDIM, C. Hydrolases in the hypopharyngeal glands of workers of *Scaptotrigona postica* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). **Genetics and Molecular Research**. v. 4, 616–623p. 2005.

CRANE, E. O livro do mel. 2ª edição. São Paulo: **Nobel**, 226 p. 1985.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microorganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 30, n. 2. 2009

FARIA, J. A F. Embalagens e conservação de mel de abelhas. **Informe Agropecuário**, v.9, n.106, 61-6 p. 1993.

GIL, J.M.S. Apicultura. Barcelona: **Aedos Barcelona**, 418 p. 1980.

GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: genus *Bacillus*. **Apidologie** v.10, 269–274p. 1979b.

GILLIAM, M. et al. Microbiology of the larval provisions of the stingless bee, *Trigona hypogea*, an obligate necrophage. **Biotropica**. v. 71, 28–31p. 1985.

GILLIAM, M.; PREST, D. B. Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 49, p. 70-75, 1987.

GILLIAM, M.; PREST, D. B.; LORENZ, B. J. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. **Apidologie**. v. 20, 53–68p. 1989.

GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J.; Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata* . **Apidologie** v. 21, 89–97p. 1990.

GONZÁLEZ, M. M. El origen, la calidad y la frescura de una miel: la interpretación de un análisis. In. : LORENZO, C. La miel de Madrid. Madrid: **Madridinnova**. 27-45 p. 2002.

GONZÁLEZ, M. M; LORENZO, C. El análisis sensorial. In. : LORENZO, C. La miel de Madrid. Madrid: **Madridinnova**. 137-160 p. 2002.

HORN, H. Méis Brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: **XI Congresso Brasileiro de Apicultura**, Teresina, PI, 403-429 p. 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 4. ed. São Paulo: **versão digital**, 1020 p. 2008.

ISLAM, A. et al. Physicochemical and antioxidante properties of Bangladesh honeys stored for more than one year. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 12, n. 177. 2012.

KERR, W. E. Meliponíneos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** v. 8, p. 22-23. 1999.

KERR, W. E. Biologia e manejo da Tiúba, a abelha do Maranhão. São Luís: **Edufma**. 156 p. 1996.

LIANDA, R. L. P. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. Rio de Janeiro, **Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Química**. Seropédica, Rio de Janeiro. 156 p. 2009.

LIANDA, R. L. P. et al. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honeys and their Extracts. **Journal Braziliam Chemical Society**. v. 23, n. 4, 618-627p.. 2012.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, 727-747 p. 2004.

MARTÍN-CARRÓN, N.; SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Effecto of dietary fibre and polyphenol-rich grape products on lipidaemia and nutritional parameters in rats. **J. Sci. Food Agric**. v. 80, 1183-1188p. 2000.

MATTIETTO, R. A. et al. Tecnologia para obtenção artesanal de hidromel do tipo doce. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (**Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 170**). v. 170, 1-2 p. 2006.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. v. 91, 571- 577p. 2005.

MELO, Z. F. N.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Estudo das alterações do Hidroximetilfurfural e da Atividade Diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande,. v. 5, n.1, 89-99p. 2003.

MENEZES, C. et al. The role of useful microorganisms to stingless bees and stingless beekeeping. In: **Pot-Honey**. Springer New York, 153-171p. 2013.

MICHENER, C. D. The bees of the world. Baltimore: **Johns Hopkins**. 307 p. 2000.

MOREIRA, R. F. A; DE MARIA, C. A. B. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, 516-525 p. 2001.

MIGDAL, W. et al. Microbiological descontamination of natural honey by irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 57, 285-288 p. 2000.

MORAES, A.L.L. et al. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática de sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginato de cálcio. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.25, n.1, 95-102 p. jan/mar, 2005.

MOURA, S. G. Boas Práticas Apícolas e a Qualidade do Mel de Abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Piauí, 2010. **Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí**, 76 p. 2010.

MOURE, J. S & KERR, W.E. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona*. **Dusenía**, v. 1. n. 2. 105-29p. 1950.

NOGUEIRA, R. H. F; MOREIRA, A. S; MOURA, J. C. Retrospectiva sobre a apicultura brasileira. In: SIMPÓSIO SOBRE APICULTURA. Jaboticabal-SP. **Anais ... Jaboticabal: UNESP**, p. 67-70. 1984.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. São Paulo, Brasil: Editora Nogueirapis. **ISBN: 85-86525-01-4**. 445 p. 1997.

OLIVEIRA, E. G. et al. Qualidade microbiológica do mel de “Tiúba” (*Melipona compressipes fasciculata*) produzido no estado do Maranhão. **Higiene Alimentar**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 133, 96-99 p. 2005.

OLIVEIRA, P. S. Relação da composição química com a origem geográfica e atividade antioxidante de méis de meliponíneos e *Apis mellifera* produzidos no estado do Pará. Belém, 2010, **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Pará**. 109 p. 2010.

OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante em méis de *M. fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae: Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae: Apini) da Amazônia. **Química Nova**. v. 35, n. 9, 1728-1732p., 2012.

OLIVEIRA, K. A. M.; RIBEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. V. Caracterização microbiológica, físico-química e microscópica de mel de abelhas canudo (*scaptotrigona depilis*) e jataí (*tetragonisca angustula*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n° 3, 239-248 p., 2013.

PAMPLONA, B. C. Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas. São Paulo, 131 p. 1989.

PAMPLONA, B. Qualidade do mel. **X Congresso Brasileiro de Apicultura**, Rio Quente, GO, 353-356 p. 1994.

PASSAMANI, L. Estudo das características físico-químicas, químicas e microbiológicas de compostos de mel produzidos no estado do Rio de Janeiro. 2005. **Dissertação (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 70 p. 2005.

PAAR, A.J. E e BOLWELL, G. P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **J.Sci. Agric.** v. 80, 985-1012p. 2000.

PEDRO, S. R. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 61(4), 348-354p. 2014.

PEREIRA, M.L. et al. Vida de prateleira do mel produzido em áreas de cerrado do estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: **Fundação Ezequiel Dias- FUNEDI**, 2004.

PÉREZ-PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ-MALAVAR, A.; VIT, P. Efecto de la fermentación postcosecha en la capacidad antioxidante de miel de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811. **BioTecnología**. v. 10, 14–20p. 2007.

PERUQUETTI, R.C. Contribuição ao estudo dos microrganismos e artrópodes associados as abelhas sem ferrão (Himenoptera: apidae). Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. s/a. **Disponível em:** <<http://www.ufv.br/>>. Acesso em: 13 de junho 2016.

PERSANO-ODO, L. et al. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciencia**. Caracas, v. 31, 867-875 p. 2006a.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants; some progress, many outstanding problems. **Plant. Mol. Biol.** v. 24, 1-20p. 1994.

ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. **Food Chem.** v. 66, 401-436p. 1999.

RODRIGUES, A. E. et al. Physical-Chemical analysis of honeybee *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* on two regions at Paraíba State, Brazil. **Cienc. Rural.**, Santa Maria, v. 35, n. 5, 1166-1171p. 2005.

RODRIGUES, D. S. A. Etnoconhecimento sobre abelhas sem ferrão: saberes e práticas dos índios Guarani mby'a na mata atlântica. **ScM Tesis**. Piracicaba Estado de São Paulo-Brasil, 2005.

ROSA, C. A. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research** v. 4, 271–275p. 2003.

SANZ, M. L; GONZÁLEZ, M. M; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Los azúcares de la miel. In.: LORENZO, C. **La miel de Madrid**. Madrid: Madridinnova. 95-108 p.. 2002.

SEEMANN, P.; NEIRA, M. Tecnología de la producción apícola. **Valdivia: Universidad Austral de Chile**, Facultad de Ciencias Agrarias Empaste, 202 p. 1988.

SILVA, R.A. et al. Composição e propriedades terapêuticas do Mel de Abelha. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 17, n° 1, 113-20 p. 2006.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras**: sistemática e identificação. Belo Horizonte, MG: Fundação Araraucária, 253p. 2002.

SNOWDON, J. A. The microbiology of honey-meeting your buyers' specifications (Why they do what they do). **American Bee Journal**, Philadelphia, v. 1, 51-60 p. 1999.

SORIA, A.C.; GONZÁLEZ, M. M; SANZ, J. Los componentes volátiles y el aroma. In.: LORENZO, C. **La miel de Madrid**. Madrid: Madridinnova. 95-108p. 2002.

SOUZA, D. C.; BAZLEN, K. Análises preliminares de características e físico-químicas de méis de tiúba (*Melipona compressipes*) do Piauí. IN: Congresso Brasileiro de Apicultura, 12: SALVADOR. **Anais...** Salvador, Conferência Brasileira de Apicultura. 267p. 1998.

SOUZA, B. A. et al. *Zygosaccharomyces lentus*: significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable to grow at low temperature. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, 520-527 p., 1999.

SOUZA, B. A. et al. Características físico-químicas de amostras de méis de *Melipona asilvai* (Hymenoptera, Apidae). **Ciência Rural**. v. 34, 1623p. 2004.

SOUZA, B. A. et al. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Tetragonisca angustula*, provenientes das regiões do litoral norte e metropolitana do estado da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Apicultura. 16, 2006. Aracajú. **Anais...** Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura, 2006.

SOUZA, B. A.; ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L. Diagnóstico da Arquitetura de ninho de *Oxytrigona tataira* (Smith, 1863) (Hymenoptera: Meliponinae). **Biota Neotropica** v. 7, 83-86p. 2007.

SOUZA, B. A. et al. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona* Illiger, 1806 (Apidae: Meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Química nova**, São Paulo. v. 32, n° 2, 303-308 p. 2009.

SOUZA, J.M.B.; AQUINO, I.S.; SANTOS, J.G. Análise Bromatológica de amostras de mel de abelha tiúba (*Meliponacompresipes fasciculada smith*) da microrregião do Seridó do Rio Grande do Norte. In: Congresso Brasileiro de Apicultura e Congresso Brasileiro de Meliponicultura, 18., 4., 2010, Cuiabá- MT, **Anais...**, Cuiabá-MT, 2010.

TEIXEIRA, A. C. P. et al. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, 339–343p. 2003.

TYSSET, C.; ROUSSEAU, M. Problem of microbes and hygiene of commercial honey. **Review Medicine Veterinary**, Marselle, v. 132, 591-600 p. 1981.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium of methods for microbiological examination of foods. Washington, DC: American **Public Health Association**, 3.ed. 914p. 1992.

VENTURIERI, G. C. Criação de abelhas indígenas sem ferrão. Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**. 31-32 p. 2005.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. F. O.; PEREIRA, C. A. B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (APIDAE: MELIPONINA), entre os agricultores familiares de Bragança - PA, Brasil. **Biota Neotropical**, v. 3, n. 2. 2003.

VENTURIERI, G. C.; RODRIGUES, S. T.; PEREIRA, C. A. B. As abelhas e a flor do açazeiro. **Mensagem Doce**, n. 80, 32-33p.. 2005.

VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. *Scaptotrigona nigrohirta* e *Melipona melanoventer* (Apidae: Meliponinae): Espécies amazônicas com potencialidades para meliponicultura.. In: IV Encontro Sobre Abelhas, 2000, Ribeirão Preto. **Anais do IV Encontro Sobre Abelhas**. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, v. 1, 356-356p. 2000.

VIDAL, R.; FREGOSI, E. V.; Mel: Características, análises físico-químicas, adulterações e transformações. **ITC**. Roberto Rios: Barretos. 95 p. 1984.

VILLAS-BÔAS, J. K.; MALASPINA, O. Parâmetros físico-químicos propostos para o controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Revista Mensagem Doce**. n. 82, 16p. 2005.

VILLAS-BÔAS, JERÔNIMO. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão**. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPAN). Brasil. 96 p. 2012.

WHITE, J.W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. Honey a comprehensive survey. London: **Heinemann**. 207-39 p. 1975.

WHITE JÚNIOR, J. W.; RUDYJ, O. N. The protein content of honey. **Journal of Apicultural Research**, v.17, n.4, 234-238 p. 1978.

WHITE JUNIOR, J. W. Methods for determining carbohydrates, hydroxymetilfurfural and proline in honey; collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 62. n. 3, 525p. 1979.

WHITE, J.W. & SICILIANO, J. Hydroximetilfurfural and honey adulteration. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Philadelphia, v. 63, n. 1, 7-10p. 1980.

YOSHIYAMA, M.; KIMURA, K. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 102, 91–96p. 2009.

ZAMORA, M. C. & Chirife, J. Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. **Food Control**, in press. 2005.