

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
TALITA MAHUDI FERREIRA DE SALES SILVERIO DA SILVA

IMPACTO DO PROCESSAMENTO NA QUALIDADE DO MEL DA ABELHA SEM  
FERRÃO

CURITIBA

2019

TALITA MAHUDI FERREIRA DE SALES SILVERIO DA SILVA

IMPACTO DO PROCESSAMENTO NA QUALIDADE DO MEL DA ABELHA SEM  
FERRÃO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Alimentação e Nutrição do Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sila Mary Rodrigues Ferreira.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Regina Beux.

CURITIBA

2019

Silva, Talita Mahudi Ferreira de Sales Silverio da  
Impacto do processamento na qualidade do mel da abelha sem ferrão [recurso eletrônico] / Talita Mahudi Ferreira de Sales Silverio da Silva – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Sila Mary Rodrigues Ferreira  
Coorientadora: Professora Dra. Marcia Regina Beux

1. *Melipona quadrifasciata*. 2. Mandaçaia. 3. Tratamento térmico. 4. Padrão de Identidade e qualidade do mel. 5. Estocagem do mel. I. Ferreira, Sila Mary Rodrigues Ferreira. II. Beux, Marcia Regina. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 641.38



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ALIMENTAÇÃO E  
NUTRIÇÃO - 40001016074P7

## TERMO DE APROVAÇÃO

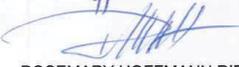
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TALITA MAHUDI FERREIRA DE SALES SILVERIO DA SILVA** intitulada: **IMPACTO DO PROCESSAMENTO NA QUALIDADE DO MEL DA ABELHA SEM FERRÃO**, sob orientação da Profa. Dra. **SILA MARY RODRIGUES FERREIRA**, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

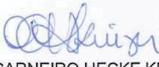
CURITIBA, 29 de Julho de 2019.

  
SILA MARY RODRIGUES FERREIRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
ROSEMARY HOFFMANN RIBANI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
CLAUDIA CARNEIRO HECKE KRUGER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho a  
minha família, meu filho  
Ian, minha mãe Silvana,  
meu pai Jobel e meu  
irmão Humberto.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente eu agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, e que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida;

A família que Deus colocou em minha vida e escolhi para viver, o meu pai Jobel Silverio da Silva, a minha mãe Silvana Ferreira de Sales, o meu irmão Humberto Cosmos Ferreira de Sales Silverio da Silva, e o meu filho Ian Silverio Delgado Sanches pelo amor, incentivo, apoio incondicional, e compreensão pela minha ausência e dedicação durante meses;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sila Mary Rodrigues Ferreira, por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, pelo suporte no tempo que lhe coube, não somente por ter me ensinado, mas por ter me feito aprender, pelas suas correções amigáveis e incentivo;

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Beux pelo sentido prático e valioso com que me orientou para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada por ter me corrigido quando necessário;

A Grazielle Oliveira, por ter me incentivado, compartilhado seu tempo e conhecimento comigo, por ter me apoiado nas horas mais difíceis sem nunca me desmotivar e por acreditar em mim. Muito obrigada por toda ajuda e paciência, nos momentos alegres e tristes;

Aos parceiros de laboratório, os alunos da Graduação de Nutrição, aos bolsistas do Programa de Apoio a Iniciação Científica, Matheus Barros da Silva e Mônica Gouveia Matos que foram fundamentais para o desenvolvimento e continuidade do trabalho, e ao CNPq e UFPR/Tesouro Nacional pelo financiamento das bolsas dos mesmos;

A Universidade Federal do Paraná, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, pela confiança no mérito e ético aqui presente. Por fim, a CAPES pela bolsa e ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa.

“Abelha fazendo mel vale o tempo que  
não voou.”

“Amor de Índio” – Beto Guedes.

## RESUMO

O mel de abelha sem ferrão (ASF) possui propriedades nutricionais e terapêuticas que podem ser reduzidas pelo tratamento térmico. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto do tratamento térmico e não térmico nas características de qualidade do mel de ASF, *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia), de duas (A e B) procedências do Paraná. Para isso, foram avaliados os tratamentos: in natura (T0), desumidificado 30 °C (T1), sonificado 52 °C (T2), aquecido 55 °C (T3), aquecido 65 °C (T4), maturado 25 °C (T5), refrigerado 4 °C (T6), e avaliado a vida de prateleira do mel aquecido a 65 °C nos tempos: Cin (in natura); C0 (ponto zero); C90 (90 dias); C180 (180 dias); C240 (240 dias) e C365 (365 dias). Nos tratamentos as amostras foram submetidas à análise de umidade, sólidos insolúveis em água, cinzas, pH, acidez total, atividade de água ( $A_w$ ), 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), atividade diastásica, cor, proteínas, vitaminas e teor de açúcares redutores e microbiológicas de bactérias aeróbio mesófilas, bactérias ácido lácticas (BAL), bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, e atividade antimicrobiana. Após aplicação dos tratamentos, as amostras A e B apresentaram redução na umidade e conseqüente redução da  $A_w$ . Os T5 e T6 ocasionaram redução do pH e maiores valores de acidez. O T1 e T5 (amostra A), e T2 e T3 (amostra B) obtiveram os maiores valores de 5-HMF. A cor, de ambas as amostras apresentou escurecimento após o T5, já o T2 foi o que menos alterou esse parâmetro. O T5 proporcionou menor redução na atividade diastásica, e todos os tratamentos reduziram a atividade enzimática do mel. O teor de cinzas e sólidos insolúveis em água não sofreu alterações significativas após os tratamentos aplicados das duas amostras. O T1 e T5 concentraram a proteína nas amostras A e B. Foi identificada a vitamina B3 na amostra A e B, e B9 na amostra B, em ambas as amostras o B3 aumentou após o T4, e diminuiu no T6, na amostra B o T5 aumentou o B9, e o T6 obteve a maior perda da vitamina. O T2, T3 e T4 reduziram a concentração de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras sem gerar danos as BAL. Não foram detectados coliformes totais, *E. coli* e *Salmonella*, em ambas as amostras. Os méis mostraram atividade antimicrobiana nos microrganismos testados. Os resultados sugerem que o T2, T3 e T4 podem ser os melhores tratamentos para mel de ASF. Na avaliação da vida de prateleira a amostra C apresentou redução na umidade, aumento na  $A_w$ , diminuição de pH e aumento de acidez e 5-HMF, intensificou a cor e reduziu a atividade diastásica. Não houve alterações no teor de sólidos insolúveis em água e cinzas. O teor de proteínas reduziu a partir do C180, compatível com o aumento do 5-HMF. A vitamina B3 identificada na amostra C não foi detectada após o C270. Não foram detectadas as bacterias ácido lácticas a partir do C90, C180 para aeróbios mesófilos e C270 bolores e leveduras, além disso, não foram detectados coliformes totais, *E. coli* e *Salmonella*. O tempo recomendável para o consumo do mel de Mandaçaia aquecido a 65 °C com garantia das propriedades terapêuticas são de, no máximo 90 dias. Os tratamentos que causaram menos impacto na qualidade do mel de Mandaçaia (amostra A e B) foram o ultrassônico, aquecido a 55 °C e aquecido a 65 °C.

**Palavras chaves:** *Melipona quadrifasciata*. Mandaçaia. Tratamento térmico. Padrão de Identidade e Qualidade do mel. Estocagem do mel.

## ABSTRACT

Stingless bee honey (ASF) has nutritional and therapeutic properties that can be reduced by heat treatment. Thus, the aim of this study was to evaluate the impact of heat and non-heat treatment on the quality characteristics of honey from ASF, *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia), from two regions of Paraná. The following treatments were performed: fresh (T0), dehumidified 30 ° C (T1), sonified 52 ° C (T2), heated 55 ° C (T3), pasteurized 65 ° C (T4), matured 25 ° C (T5), refrigerated at 4 ° C (T6), and evaluated the shelf life of pasteurized honey at 65 ° C at times: Cin (in natura); C0 (zero point); C90 (90 days); C180 (180 days); C240 (240 days) and C365 (365 days). The analyses were performed in all treatments moisture, water-insoluble solids, ashes, pH, total acidity, water activity ( $A_w$ ), 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), diastatic activity, color, protein, vitamins and reducing sugars, microbiological analyzes were mesophilic aerobic bacteria, lactic acid bacteria (BAL), mold and yeast, total coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and antimicrobial activity. After application of the treatments, samples A and B showed reduction in humidity and consequent reduction of  $A_w$ . T5 and T6 caused a reduction in pH and higher acidity values. T1 and T5 (sample A), and T2 and T3 (sample B) obtained the highest 5-HMF values. The color of both samples showed darkening after T5, where as T2 was the one that least changed this parameter. T5 was the one that provided the smallest reduction in diastatic activity, All treatments reduced the enzymatic activity of honeys. The ash content and water insoluble solids did not change significantly after the treatments applied in both honeys. T1 and T5 generated protein concentration in samples A and B. Vitamin B3 was identified in sample A and B, and B9 in sample B, in both samples B3 increased after T4 and decreased in T6 in sample B. T5 increased B9, and T6 obtained the greatest vitamin loss. T2, T3 and T4 reduced the concentration of mesophilic aerobic, mold and yeast without causing damage to BAL. No total coliforms, *E. coli* and *Salmonella* were detected in both samples. The honeys showed high antimicrobial activity in all microorganisms tested. The results suggest that the best treatments for ASF honey would be T2, T3 and T4. In the evaluation of storage, sample C decreased moisture, increased  $A_w$ , pH decreased, acidity increased, increased 5-HMF, honey darkened and there was a reduction in diastatic activity. There were no changes in the content of water insoluble solids and ashes. The protein content decreased from C180. Vitamin B3 identified in sample C was not detected after C270. Lactic acid bacteria from C90, C180 for mesophilic aerobic and C270 mold and yeast were not detected, and no total coliforms, *E. coli* and *Salmonella* were detected. The recommended time for consumption of pasteurized Mandaçaia honey at 65 °C with a guarantee of therapeutic properties is a maximum of 90 days. The treatments that had the least impact on the quality of Mandaçaia honey (sample A and B) were ultrasonic, heated to 55 °C and pasteurized at 65 °C.

**Keywords:** *Melipona quadrifasciata*. Mandaçaia. Heat treatment. Honey identity and quality standard. Storage honey.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - ANATOMIA DA ABELHA SEM FERRÃO .....	15
<b>FIGURA 2</b> - ESPÉCIE DE ABELHA SEM FERRÃO ( <i>MELIPONINAE SPP.</i> ) EM DIFERENTES LOCALIZAÇÕES GEOGRÁFICAS NO TERRITÓRIO BRASILEIRO	16
<b>FIGURA 3</b> - ABELHAS MELIPONA QUADRIFASCIATA QUADRIFASCIATA (A), MELIPONA QUADRIFASCIATA ANTHIDIODES (B), E A MANDAÇAIA MESTIÇA (C) .....	17
<b>FIGURA 4</b> - ILUSTRAÇÃO DOS POTES PERFURADOS E O ESCOAMENTO DO MEL .....	31
<b>FIGURA 5</b> - ETAPAS DO PROCESSO DE AQUECIMENTO A 65 °C .....	35
<b>FIGURA 6</b> - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA SUBMETIDO AO TRATAMENTO TÉRMICO .....	63
<b>FIGURA 7</b> - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA AQUECIDO A 65 °C .....	77

## **LISTA DE QUADROS**

**QUADRO 1- CLASSIFICAÇÃO ZOOLOGICA DAS ASF (MELIPONINAE) ..... 14**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> PARÂMETRO DE IDENTIDADE ESTABELECIDO PARA MÉIS DE ABELHA SEM FERRÃO NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.....	21
<b>TABELA 2</b> - PARÂMETRO MICROBIOLÓGICO ESTABELECIDO PARA O MEL DE ABELHA SEM FERRÃO .....	25
<b>TABELA 3</b> – TRATAMENTOS TÉRMICOS E NÃO TÉRMICOS APLICADOS NO MEL DA MELIPONA MANDAÇAIA.....	33
<b>TABELA 4</b> - CLASSIFICAÇÃO DA ESCALA PFUND.....	40
<b>TABELA 5</b> - CORRELAÇÃO COM A PROPORÇÃO DE CALDO PARA MEL, E O INÓCULO BACTERIANO EXPRESSOS EM ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) .....	44
<b>TABELA 6</b> - CARACTERÍSTICA FÍSICO-QUÍMICA DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA ANTES E APÓS OS TRATAMENTOS.....	47
<b>TABELA 7</b> - VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO .....	56
<b>TABELA 8</b> - VALORES DA LETALIDADE PARA BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA, AERÓBIO MESÓFILO, BOLORES E LEVEDURAS, COLIFORMES TOTAIS, E. COLI, E SALMONELLA SPP. NO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO .....	59
<b>TABELA 9</b> - CARACTERÍSTICA FÍSICO-QUÍMICA DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA AQUECIDO A 65 °C.....	67
<b>TABELA 10</b> – VALORES DA LETALIDADE DE AERÓBIO MESÓFILO, BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA, BOLORES E LEVEDURAS, COLIFORMES TOTAIS, E. COLI, E SALMONELLA SPP. NO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA APÓS O AQUECIMENTO A 65 °C .....	75

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
2.1 MELIPONICULTURA .....	13
2.3.1 Parâmetros de identidade e qualidade .....	20
2.3.2 Microbiologia .....	25
2.4 TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO APLICADO EM MEL .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 COLETA DA AMOSTRA .....	31
3.2 MATERIAL .....	32
3.2.1 Delineamento experimental do tratamento térmico e não térmico aplicado no mel de ASF <i>M. Mandaçaia</i> .....	32
3.2.1.1 In natura .....	33
3.2.1.2 Desumidificado .....	33
3.2.1.3 Sonicado .....	33
3.2.1.4 Aquecido .....	34
3.2.1.5 Maturado .....	34
3.2.1.6 Refrigerado .....	34
3.2.2 Ensaio experimental da vida de prateleira do mel ASF <i>Melipona Mandaçaia</i> aquecido a 65 °C .....	34
3.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA .....	35
3.3.1 Umidade .....	36
3.3.2 Sólidos insolúveis em água .....	36
3.3.3 Cinzas .....	37
3.3.4 pH .....	37
3.3.5 Acidez total .....	37
3.3.6 Atividade de água .....	38
3.3.7 5-Hidroximetilfurfural .....	38

3.3.8 Atividade Diastásica .....	39
3.3.9 Cor.....	40
3.3.10 Determinação de proteína .....	40
3.3.11 Vitaminas hidrossolúveis .....	41
3.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	42
3.4.1 Atividade antimicrobiana .....	43
3.4.2 Análise estatística .....	45
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
4.1 ENSAIO EXPERIMENTAL DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS E NÃO TÉRMICOS .....	46
4.1.1 Característica físico-química .....	46
4.1.2 Identificação e quantificação das vitaminas hidrossolúveis do mel de Mandaçaia antes e após os tratamentos térmicos .....	55
4.1.4 Atividade antimicrobiana do mel de Mandaçaia após os tratamentos térmicos.....	62
4.2 ENSAIO EXPERIMENTAL DE VIDA DE PRATELEIRA.....	66
4.2.1 Característica físico-química .....	66
4.2.2 Contagem microbiológica .....	74
4.2.3 Atividade antimicrobiana do mel de <i>Melipona</i> Mandaçaia aquecido a 65 °C .....	76
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O mel de abelha sem ferrão (ASF) pode ser uma matéria-prima inovadora nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas devido aos seus constituintes bioativos e propriedades biológicas (ÁVILA et al., 2018). Tem sido apontado como cicatrizante, antimicrobiano e de alto potencial antioxidante (RAO et al., 2016). Além disso, sua microbiota pode conter bactéria ácido láctica (BAL), microrganismos benéficos com *status GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) que produzem compostos antimicrobianos como ácidos orgânicos e bacteriocinas (VÁZQUEZ-QUIÑONES et al., 2018). Esses atributos fazem do mel um alimento probiótico e que gera benefícios para saúde (ORTIZ et al., 2016). O mel da ASF, pela alta umidade, está propenso a fermentação que resulta em menor tempo de prateleira, em razão da conservação na estocagem do produto (NORDIN et al., 2018).

Assim, para prolongar a vida útil e eliminar microrganismos deteriorantes são utilizados métodos de processamentos como a refrigeração, desumidificação, pasteurização e maturação (CAMARGO et al., 2017). Outras formas de processamento que utilizam baixas temperaturas podem proporcionar menor perda nas características funcionais do mel, como o tratamento térmico suave ultrassônico. Essa tecnologia é simples, vantajosa e economicamente viável, pois acelera a secagem por produzir maior velocidade de remoção de água (TAO et al., 2015). Porém, as técnicas de processamento podem causar mudanças irreversíveis nas propriedades naturais do mel, como deterioração dos açúcares, perda de atividade enzimática e da microbiota benéfica (CHONG et al., 2017), com consequente aumento do conteúdo de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), que resultante da reação de *Maillard* (SHIBAO; BASTOS, 2011; TORNUK et al., 2013).

Diante do exposto, como não existem protocolos e normas que indicam o tempo e temperatura adequados para preservar as propriedades benéficas no processamento do mel de ASF, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto dos tratamentos térmicos e não térmicos na qualidade do mel de ASF, *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MELIPONICULTURA

A Meliponicultura é a atividade de criação de abelhas sem ferrão (ASF), que vem sendo desenvolvida desde as antigas civilizações com intuito de produzir e comercializar mel e seus derivados, porém, os estudos e a comercialização ainda são recentes no mundo. Como o Brasil possui regiões de clima tropical que favorecem a proliferação das ASF, é o país que tem a maior ocupação mundial e diversidade dessas abelhas que são encontradas em todo o território nacional (VILLAS-BÔAS, 2012; SOUSA et al., 2013).

A criação racional de ASF iniciou-se nas tribos indígenas e a nomenclatura dessas abelhas é devido ao seu legado, que se tornou cada vez mais tradicional com o passar do tempo para pequenos e médios produtores. A meliponicultura se mostra uma técnica simples de fácil execução e manutenção, e pode ser realizada tanto em meio rural quanto urbano, sendo assim, pode ser atividade economicamente viável, com fins lucrativos para os produtores (CORTOPASSI, 2006).

As ASF são classificadas em superfamília: *Apoidea* e *Apidae*, pertencentes à subfamília *Apinae*, *Meliponinae*, *Bombinae* e *Euglossinae* (KERR, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012). Pertencentes à família *Apidae*, a subfamília *Meliponinae* divide-se em duas tribos: a *Meliponini* e a *Trigonini*, tendo como característica marcante a arquitetura da entrada da colmeia e do ninho, que pode ser diferente até mesmo entre as espécies da mesma tribo (ROUBIK, 2006; BALLIVIÁN, 2008). As rainhas poedeiras são as responsáveis pela reprodução da espécie, e em caso de morte ou emigração das mesmas, as denominadas princesas, que chegam a representar 25% dos indivíduos da colmeia, às substituem e se torna a rainha da colônia (CARVALHO-ZILSE et al., 2012).

As operárias não são fecundadas e correspondem à maior parte da colônia representando até 80% desses indivíduos. No entanto, realizam a manutenção geral da colônia e atividades como construção, defesa da colmeia,

coleta e processamento do alimento. O Quadro 1 apresenta a classificação completa das ASF.

QUADRO 1- CLASSIFICAÇÃO ZOOLOGICA DAS ASF (*MELIPONINAE*)

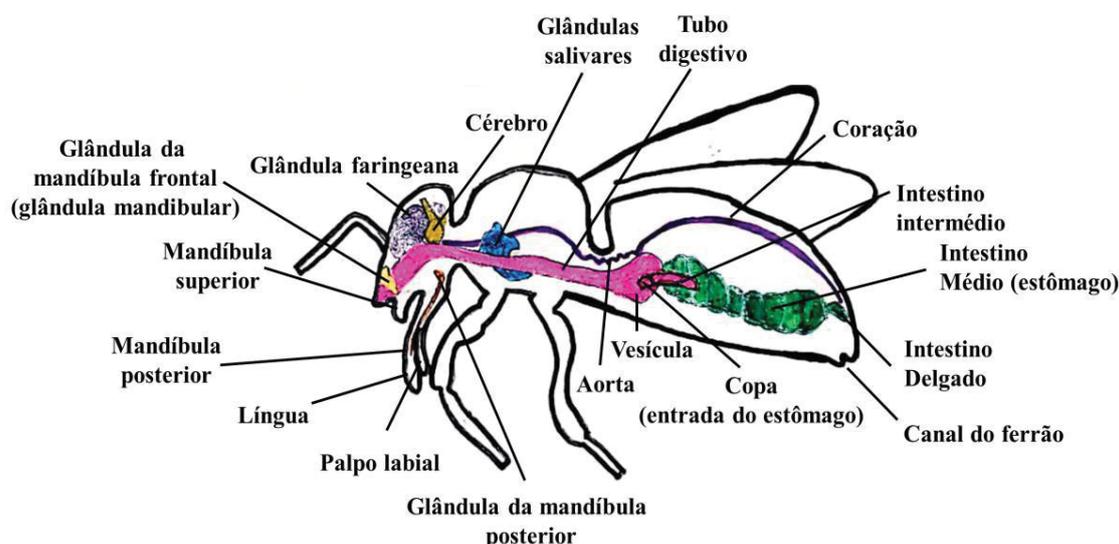
<b>Reino</b>	<b>Animália</b>
Filo	<i>Arthropoda</i>
Classe	<i>Insecta</i>
Ordem	<i>Hymenoptera</i>
Subordem	<i>Aprocrita</i>
Superfamília	<i>Apoidea</i>
Família	<i>Apidae</i>
Subfamília	<i>Meliponinae</i>
Tribos	<i>Meliponini, Trigonini</i>

FONTE: Adaptado de KERR et al. (1996).

Já os machos possuem como principal atividade o acasalamento com as princesas e realizam esporadicamente a desidratação do néctar e manipulação da cera, auxiliando na construção do ninho (VILLAS-BÔAS, 2012). Devido ao fato de possuírem ferrão atrofiado ou ausência dele, como ilustrado na Figura 1, os meliponídeos desenvolveram estratégias de defesas, variando de acordo com a espécie de abelha.

Outras espécies fecham a entrada da colmeia com resina e cera quando se sentem ameaçadas, algumas abelhas com o nível maior de agressividade como, por exemplo, a ASF da espécie *Oxytrigona tataira*, ao ser manejado liberam uma secreção caustica (ácido fórmico) pela suas glândulas salivares sendo capazes de queimar a pele (KERR et al., 1996).

FIGURA 1 - ANATOMIA DA ABELHA SEM FERRÃO  
CABEÇA TÓRAX ABDÔMEN

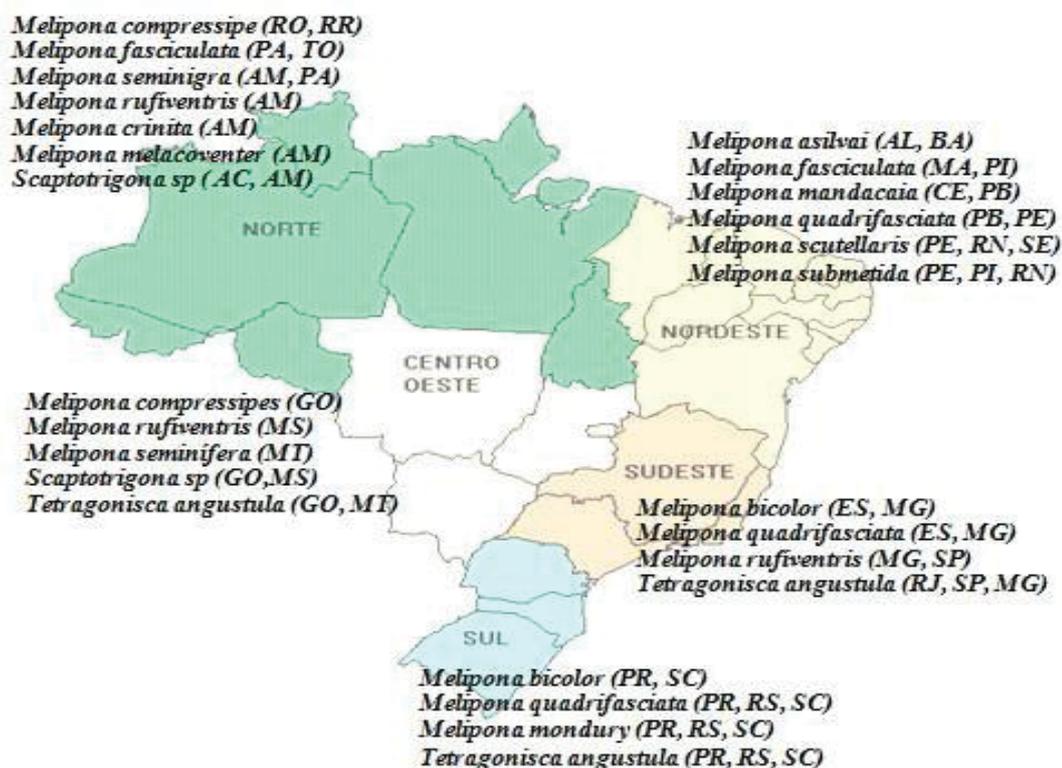


FONTE: Ávila et al. (2018).

Além da produção de mel, as ASF oferecem pólen, geoprópolis formada pela mistura de barro, cerume e própolis que funciona como cimento para construção da entrada dos ninhos. A coloração destes subprodutos varia de acordo com o material que os constituem, sendo esse um dos principais atrativos para criação dessa espécie. Além da importância de seus produtos, a principal função na natureza é a polinização das flores, e consequentemente a produção de frutos e sementes (BALLIVIÁN, 2008; VILLAS-BÔAS, 2012; FRAZÃO, 2013).

Em 2012, o Instituto de Biociências e a Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, realizaram um trabalho voltado a compreender como a mudança de clima influencia em diferentes espécies de ASF. Foi verificado que há perdas no cenário e nas características de cada espécie, para isso, foi mapeado o refúgio climático das abelhas e encontrado condições adequadas para a sobrevivência (GIANNINI et al., 2012). Na Figura 2 pode ser observada a distribuição das ASF no território brasileiro.

FIGURA 2 - ESPÉCIE DE ABELHA SEM FERRÃO (*MELIPONINAE SPP.*) EM DIFERENTES LOCALIZAÇÕES GEOGRÁFICAS NO TERRITÓRIO BRASILEIRO



FONTE: Villas-Bôas (2012), adaptado por Biluca et al. (2014).

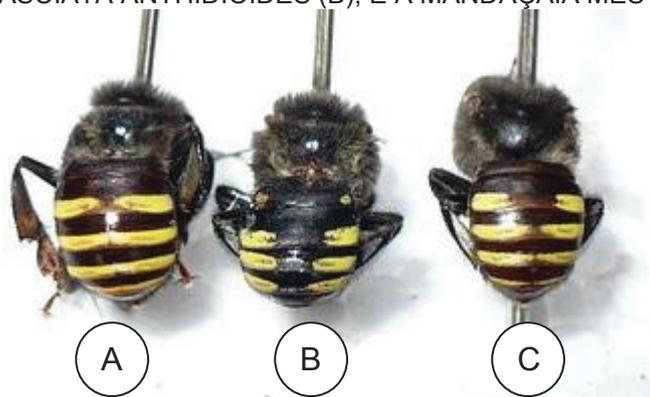
Foram contabilizados aproximadamente 250 nomes válidos para espécies de ASF no território brasileiro, das quais estimam que cerca de 35 possam ser encontradas no estado do Paraná, destacando a Jataí (*Tetragonisca angustula*), a Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), as Mirins (*Plebeia spp.*), a Tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*), a Irapuá (*Trigona spinipes*) e a Irati (*Lestrimelitta limão*) (SILVEIRA et al., 2002).

O declínio na biodiversidade e a mudança de clima são fatores que danificam a disponibilidade das flores e alimentos, reduzindo a quantidade de ASF que já estão em extinção devida também à degradação ambiental. Esses fatores podem causar declínio significativo na produção de alimentos, ocasionando insegurança alimentar e nutricional (IMPERATRIZ-FONSECA, 2012; REYES-GONZÁLEZ et al., 2016).

## 2.2 ABELHA SEM FERRÃO MELIPONA QUADRIFASCIATA- MANDAÇAIA

A *Melipona quadrifasciata* é popularmente conhecida pelo nome de *Mandaçaia*, uma palavra indígena que significa “vigia bonito” pelo motivo de sempre ter uma abelha na entrada da colmeia. Essa é uma espécie de abelha social pertencente à tribo *Meliponini* (SILVEIRA et al., 2002), como ilustrado na Figura 3.

FIGURA 3 - ABELHAS MELIPONA QUADRIFASCIATA QUADRIFASCIATA (A), MELIPONA QUADRIFASCIATA ANTHIDIOIDES (B), E A MANDAÇAIA MESTIÇA (C)



FONTE: Criar abelhas (2019).

A *Melipona quadrifasciata* MQQ (A) mostrada na Figura 3 faixas terciais e variam de três a cinco listras contínuas, a *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier - MQA (B) de duas a cinco com interrupção entre as mesmas, já na Mandaçaia mestiça (C) que é resultado do cruzamento das duas subespécies, é encontrada a mistura dessas faixas. A Mandaçaia tem o corpo robusto chegando a medir de 7 a 15 mm (AIDAR, 1996).

A *M. Mandaçaia* MQQ (A) é encontrada principalmente em regiões mais altas e frias, tendo ocorrência principal no Sul de São Paulo, no Paraná e em Santa Catarina. A MQA (B) está distribuída nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí, Roraima, Sergipe, portanto, é uma subespécie de climas com temperaturas mais elevadas. Em algumas regiões do Estado de São Paulo e Minas Gerais são encontradas as abelhas mestiças (C) com mais frequência (AIDAR, 1996).

Como dito anteriormente, as abelhas possuem papel importante para a polinização de diversas culturas. A *M. Mandaçaia* é a principal espécie utilizada para polinizar o abacate, açaí, goiaba, guaraná, melancia e o tomate (ROCHA,

2012). Del Sarto et al. (2005), sugerem que apenas dois ninhos de *M. quadrifasciata* seriam o suficiente para polinizar uma estufa com 858 a 1534 plantas de tomates, com proporção de 429 a 767 plantas por ninho, e com uma estimativa de 28 a 50 flores visitadas por ASF para coleta de pólen.

No estudo realizado por Bartelli et al. (2014), com produção de tomates em estufa, foi comparada a polinização mecânica com a polinização pela *Melipona quadrifasciata* Lepeletier. Os autores notaram que as flores visitadas pelas abelhas apresentaram 47% mais sementes, com teor de açúcar 14% maior em comparação com a polinização mecânica. Além disso, uma colmeia dessa subespécie produz de 1,5 a 2 litros de mel por ano na natureza, com a manipulação racionalizada pode produzir até 2 a 3 litros de mel por ano (SILVEIRA et al., 2002).

As abelhas *M. quadrifasciata*, ao construir os seus ninhos, podem coletar excrementos de animais vertebrados, e gerar consequente contaminação por coliformes fecais e *Escherichia coli* no mel. Tal comportamento pode ser encontrado em geral na ASF da tribo *Meliponini* (NOGUEIRA-NETO, 1997; GONÇALVES et al., 2009; BILUCA et al., 2014). Contudo, percebe-se a necessidade em elaborar uma padronização de processamento do mel, e parâmetros de identidade e qualidade para fins comerciais desse alimento. Todavia, não existe lei e nem norma internacional com métodos oficiais para o controle de qualidade do mel de ASF, tornando a comercialização mundial desse produto limitada, além de grande obstáculo de mercado para os produtores (ÁVILA et al., 2018).

### 2.3 MEL: DEFINIÇÃO, CARACTERÍSTICA FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA

O mel é uma substância doce natural produzida pelas abelhas a partir do néctar, ou de secreções de partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, acumulam e transformam combinando com suas próprias secreções, que possuem substâncias específicas que são depositadas, desidratadas e armazenadas em potes de cera para amadurecer (CODEX, 2001).

O mel é um alimento viscoso e aromático, conhecido, consumido e apreciado por diversas pessoas no mundo (PUSCAS et al., 2013). Um dos

fatores que influencia as características do mel é a espécie, pois, as abelhas possuem referencias alimentares que as diferenciam. Essas peculiaridades são responsáveis por gerarem méis que possuem características específicas (VILLAS-BÔAS, 2012).

O mel produzido pela ASF é armazenado em potes de cerume, produto da resina vegetal que as abelhas coletam, em seguida, as operárias secretam as enzimas de suas glândulas cefálicas e ocorre a hidrólise da sacarose em frutose e glicose (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010; PIMENTEL, et al., 2013). Contudo, a composição terapêutica do mel é influenciada pela presença de fitoquímicos do cerume (TEMARU et al., 2007). Além disso, o mel apresenta expressiva atividade antioxidante, devido à presença de ácidos fenólicos e flavonóides que são originários das fontes florais do néctar coletado pelas abelhas (SILVA et al., 2013).

Em razão do baixo pH, alto teor de umidade e atividade de água, alta viscosidade e pressão osmótica elevada o mel de ASF geralmente possui baixa contagem de microrganismos. No entanto, as leveduras causadoras de fermentação possuem crescimento significativo nestas condições (SILVA et al., 2013). O mel da ASF é constituído por solução concentrada frutose e glicose e sacarose. Também apresenta uma mistura complexa de enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias bactericidas e aromáticas, ácidos fenólicos, flavonóides, grãos de pólen, podendo ainda conter fragmento de cerume em que o mel é armazenado pelas abelhas (OLIVEIRA et al., 2012).

A coloração o aroma e o sabor do mel de ASF são compostos dependentes das flores, das regiões geográficas, da espécie de abelhas, do clima onde são produzidos, além do processamento, manuseio, embalagem e tempo de armazenagem (TORNUK et al., 2013). Sendo este um alimento que não poderá ser adicionado açúcares, ou qualquer substância que altere a sua composição original, as mudanças acarretam adulterações no produto e trazem diferenciação nas características sensoriais e nutricionais que são características do mel (PARANÁ, 2017).

Dessa forma, a qualidade do mel é fundamental para sua valorização no mercado interno, e como produto de exportação. A avaliação dos fatores

que alteram a composição do mel como a manipulação e o processamento são importantes para comprovar a sua qualidade, protegendo o consumidor de possíveis fraudes ou de produtos com qualidade inferior, mantendo os benefícios à saúde e garantindo a autenticidade (ANKLAM, 1998; FÉAS et al., 2010).

### 2.3.1 Parâmetros de identidade e qualidade

O regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de ASF é dividido em parâmetros físico-químicos de maturidade, pureza e deterioração com os limites mínimos e máximos estabelecidos. No Estado da Bahia possui legislação própria descrita na Portaria ADAB N° 207 DE 21/11/2014 (BAHIA, 2014), no Amazonas a Portaria n° 253, de 31 de Outubro de 2016 (AMAZONAS, 2016), em São Paulo tem-se a Resolução SAA - 52, de 310 de Outubro de 2017 (SÃO PAULO, 2017) e no Paraná a Portaria n° 63, de 10 de Março de 2017 (PARANÁ, 2017).

No Espírito Santo, pela Instrução Normativa n° 001, de 17 de abril de 2019, foi disposta uma lista de espécies de ASF com ocorrência no Estado. Para a comercialização o lote deve possuir a denominação taxonômica da espécie da ASF, documentação comprovada para possível rastreamento quanto à origem floral, por meio da análise melissopalínológica (ESPÍRITO SANTO, 2019).

O Departamento da Malásia publicou os padrões de qualidade para mel de ASF para regular a venda e distribuição do mel no país (MALAYSIAN STANDARTS, 2017). A comparação entre os padrões é apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 - PARÂMETRO DE IDENTIDADE ESTABELECIDO PARA MÉIS DE ABELHA SEM FERRÃO NO TERRITÓRIO BRASILEIRO

Parâmetros	Bahia	Amazonas	São Paulo	Paraná	Espírito Santo	Malásia
Açúcares redutores (%)	Mín. 60	Mín. 50	Mín. 60	Mín. 47	Mín. 60	Máx. 85.0
Sacarose (%)	Máx. 6	Máx. 6	Máx. 6	Máx. 5	Máx. 6	Máx. 7.5
Umidade (%)	Máx. 35 / Máx. 19*	Máx. 35 / Máx. 22*	Máx. 40 / Máx. 20*	Máx. 35 / Máx. 20*	Máx. 40 / Máx. 20*	Máx. 35
Sólidos insolúveis em água (%)	Máx. 0.1	-				
Cinzas (%)	Máx. 0.6	Máx. 0.6	Máx. 0.6	Máx. 0.8	Máx. 0.6	Máx. 1.0
Pólen	Presença de grãos de pólen	Presença de grãos de pólen	Presença de grãos de pólen	Presença de grão de pólen	Presença de grão de pólen	-
pH	-	-	2.9 a 4.5	Máx. 4.7	2.9 a 4.5	2.5 a 3.8
Acidez (meq.kg <sup>-1</sup> )	Máx. 50	Máx. 80	Máx. 50	Máx. de 60	Máx. 50	-
Atividade de água	-	-	0.52 a 0.8	-	0.52 a 0.8	-
HMF** (mg kg <sup>-1</sup> )	Máx. 10	Máx. 40	Máx. 20	Máx. 40	Máx. 20	Máx. 30
Atividade diastásica (Escala Göthe)	Máx. 0.3***	Máx. 0.3***	-	Máx. 40***	-	-
Cor	Quase incolor a pardo-escuro	-				

(-): Não analisado

\* Valores de umidade estabelecidos para méis desidratados e/ou desumidificado

\*\* Hidroximetilfurfural

\*\*\* Valores de tolerância mínima e máxima de atividade diastásica se o HMF for menor que 15,00 meq kg<sup>-1</sup>

FONTE: Bahia (2014); Amazonas (2016); São Paulo (2017); Paraná (2017); Espírito Santo (2019); *Malaysian Standarts* (2017).

No mel de ASF a frutose é o açúcar predominante em sua composição, e influencia na intensidade do sabor adocicado e na alta higroscopicidade, mantendo o mel líquido por muito tempo ou podendo nunca cristalizar (ESCUREDO et al., 2014). A glicose é o segundo açúcar presente em maior quantidade no mel de ASF, e quando existe uma predominância de sua composição, o mel tende a cristalizar por ter menor solubilidade aumentando assim sua precipitação (DA SILVA et al., 2016). Em menor quantidade tem-se a sacarose, que pode atribuído à coleta precoce do mel e indicar adulteração pela adição de açúcar comercial (DE SOUSA et al., 2016).

O aquecimento ou estocagem prolongada podem degradar os açúcares do mel gerando compostos indesejáveis, como o 5-HMF (MOREIRA, 2010). Esse composto pode estar relacionado com reações de escurecimento

não enzimático (Reação de *Maillard*) e a caramelização dos açúcares (CHERNETSOVA; MORLOCK, 2012; DA SILVA et al., 2016).

A umidade é uma propriedade que interfere na maturidade, viscosidade, peso específico, cristalização, vida de prateleira e características sensoriais (BIJLSMA et al., 2006; GUERRINI et al., 2009). Além disso, o período de coleta e aspectos de processamento podem afetar fortemente esse parâmetro (SILVANO et al., 2014), que pode estar relacionado às características do ambiente em que o mel foi produzido, entre outros fatores, como condições climáticas, estação do ano (SILVA et al., 2010), produção a partir do néctar de frutas maduras, flores rasteiras e diferentes espécies de abelhas (RAMÓN-SIERRA et al., 2015).

Biluca et al. (2016), encontraram valores de umidade na faixa de 23,1 a 43,5%, sendo os maiores valores para o mel da espécie *M. quadrifasciata* e os menores da *M. scutellaris*, *T. angustula* e *S. bicunctata*, produzidos da mesma florada. Pode-se perceber que o mel da ASF tem a composição diferente até mesmo entre as subespécies, principalmente do mel da *Apis mellifera*, mesmo quando produzidas na mesma região.

O teor de sólidos insolúveis corresponde às impurezas no mel, como resíduos de cera, grãos de pólen, fragmentos das abelhas, além de outros elementos inerentes do mel ou processamento que foi submetido (BRASIL, 2000; SILVA, 2015). Além disso, pode estar relacionado com os hábitos da abelha em relação à escolha do local para a deposição dos méis nos favos (ALVES et al., 2011; SILVA, 2015), falhas durante a coleta, filtração e/ou decantação no final do processo da coleta pelo apicultor, outrossim, é um fator que influencia o teor de cinzas (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2005). A concentração de sólidos insolúveis ideal é de no máximo 0,1% de acordo com os parâmetros dispostos nos estados da Bahia (2014); Amazonas (2016); São Paulo (2017); Paraná (2017) e Espírito Santo (2019).

O teor de cinzas, representando o total de minerais presentes no mel, está relacionado aos aspectos ambientais, geográficos e botânicos da região onde o mel é produzido (FINOLA et al., 2007; DE SOUSA et al., 2016), assim como o néctar das plantas que também absorvem do solo contaminantes inorgânicos, como pesticidas (MONIRUZZAMAN et al., 2014), ou possíveis

contaminações mediante do ar em néctar de plantas urbanas. Os minerais com predominância no mel de ASF são potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), e manganês (Mg) (NORDIN et al., 2018).

Os méis de coloração mais escura têm uma riqueza superior em minerais comparados aos mais claros, tendo uma porcentagem de minerais expressas em cinzas totais, que varia de 0,02 a 0,6% (FINOLA et al., 2007). Méis produzidos com o néctar da mesma origem botânica não diferem em relação ao teor de cinzas, mesmo para diferentes espécies de abelhas (DE SOUSA et al., 2016).

O mel de ASF apresenta geralmente valor de baixo pH, variando entre 3,1 a 5,3, que pode inibir a presença e crescimento de microrganismos patogênicos, influenciando positivamente a estabilidade, o prazo de validade e a textura do mel (FEÁS et al., 2010; BILUCA et al., 2016). O pH varia de acordo com a origem geográfica, botânica, conteúdo mineral, composição do solo, substâncias mandibulares das abelhas acrescentadas ao néctar, como proteases, lipases, lactases, e proteínas adicionadas pelas abelhas ao transportar o mel até a colmeia (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2005; VANHANEN; EMMERTZ, 2011; ELIAS-SANTOS et al., 2013).

O valor da acidez corresponde ao equilíbrio de ácidos orgânicos presentes no mel, que varia de acordo com a composição floral e espécie de abelhas (ÁVILA et al., 2018). Alta acidez pode indicar a fermentação de açúcares para o álcool por microrganismos, em ácidos orgânicos ou vias enzimáticas, e por leveduras formando o ácido total no mel (SANCHO et al., 2013; DA SILVA et al., 2016).

A atividade de água ( $A_w$ ) depende principalmente do teor de glicose e frutose. Durante a cristalização, inicialmente, a glicose cristaliza e a frutose permanece em solução por mais tempo, por possuir maior solubilidade (GLEITER et al., 2006). O teor de água livre necessário para o desenvolvimento de microrganismos difere, sendo em torno de 0,70 para fungos; 0,80 para leveduras e 0,90 para bactérias, e a levedura osmofílica que se desenvolve em altas concentrações de açúcar e com a  $A_w$  mínima até 0,6 (GLEITER et al., 2006). Devido a  $A_w$  ser um parâmetro recente estendido ao mel (ÁVILA et al., 2018), não há limite sugerido na legislação atual para a

maioria dos estados brasileiros, exceto em São Paulo e Espírito Santo com o limite de  $A_w$  para mel de ASF, de no máximo 0,52 a 0,80, respectivamente (SÃO PAULO, 2017; ESPÍRITO SANTO, 2019).

O conteúdo de 5-HMF é reconhecido como parâmetro de frescor do mel e, geralmente, está ausente em amostra recém-colhida, ainda assim, pode apresentar uma correlação positiva frente à capacidade antioxidante do mel (PASIAS et al., 2017; ZHAO et al., 2018). Há uma possível resistência a formação de 5-HMF em méis de ASF após os tratamentos térmicos, devido a características particulares de cada mel, como o predomínio de frutose e baixas concentrações de glicose, elevada  $A_w$ , umidade e acidez. Concluindo-se que quanto maior o teor de glicose mais veloz será a reação de *Maillard*. Quando a  $A_w$  e a acidez são elevadas, estas reduzem a velocidade da reação de *Maillard*, e conseqüentemente é inibida a formação de 5-HMF (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; BILUCA et al., 2014).

O mel apresenta em sua composição a diástase ( $\alpha - \beta$  amilases), enzima sensível ao calor que pode ser utilizada para indicar condições de superaquecimento e o grau de conservação. Portanto, a atividade enzimática é reduzida quando o mel é submetido a um aquecimento acima de 60 °C (AHMED et al., 2013; YUCEL; SULTANOGLU, 2013; PASIAS et al., 2017). A principal enzima responsável pela transformação química do néctar do mel é a invertase, originada da glândula hipofaríngea das abelhas. A invertase hidrolisa a sacarose em glicose e frutose, e, outros açúcares mais complexos se formam em pequenas quantidades. (ARAÚJO et al., 2006; AHMED et al., 2013).

A cor, por ser um parâmetro visual, é considerada o atributo mais atraente do mel, e importante para a comercialização por ser correlacionada diretamente com a aceitação e preferência do consumidor (CHAIKHAM et al., 2016). A cor do mel varia de acordo com o pH, pólen, origem geográfica e o método de produção. Além disso, os minerais são componentes que afetam a cor do mel, sendo os méis com cores mais claras os que contêm menos cinzas do que os méis mais escuros (BERTONCELJ et al., 2011; AL et al., 2009; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013; SOLAYMAN et al., 2016). Contudo, todo

mel puro escurece gradualmente devido a várias reações não-enzimáticas de escurecimento (Reação de *Maillard*) (CAN et al., 2015), exposição à luz, calor e tempo de estocagem (DE SOUSA et al., 2016). No mel de ASF a cor varia de 26 a 150 nm, e é classificada pela faixa de cores da escala Pfund (NORDIN et al., 2018).

### 2.3.2 Microbiologia

Para a comercialização segura do mel de ASF foram estabelecidos normas e níveis máximos de contaminantes, pois condições precárias de higiene durante a colheita do mel podem ocasionar contaminação do produto. Para isso, parâmetros microbiológicos referente à tolerância de coliformes a 45 °C, *Salmonella*, bolores e leveduras foram preconizados em alguns estados brasileiros, como a Bahia (2014), Amazonas (2016), São Paulo (2017), Paraná (2017) e no Espírito Santo (2019). Nota-se, que os parâmetros microbiológicos entre os estados citados não apresentam variações, uma vez que é baseado na legislação voltada para mel de *Apis mellifera*, (CODEX, 2001), conforme mostrado na Tabela 2.

TABELA 2 - PARÂMETRO MICROBIOLÓGICO ESTABELECIDO PARA O MEL DE ABELHA SEM FERRÃO

Microrganismo	Tolerância para amostra indicativa	Tolerância para amostra representativa			
		n	c	m	M
Coliformes a 45 °C (NMP/g ou mL)	10 <sup>2</sup>	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella spp.</i> em 25g	Ausência	5	0	Ausência	-
Bolores e leveduras (UFC/g)	10 <sup>4</sup>	5	2	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>

n: número de unidades a serem colhidas aleatoriamente em um mesmo lote e analisada individualmente

c: número máximo aceitável de unidades de amostra com contagens entre os limites de m e M

m: é o limite que em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável

M: limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável (valores acima de M são inaceitáveis)

FONTE: Bahia (2014); Amazonas (2016); São Paulo (2017); Paraná (2017); Espírito Santo (2019).

A microbiota do mel pode ser dividida em dois grupos: os inerentes ao mel e os de contaminação secundária. As fontes primárias de microrganismos

são: néctar, pólen, trato digestivo da abelha, poeira, ar e flores (SNOWDON; CLIVER, 1996; MENDES, 2009). As fontes secundárias de contaminação podem ser o ser humano, manipulação inadequada, equipamentos, recipientes, vento, poeira, água e insetos, tal como ocorrem em outros alimentos (TYSSET; ROUSSEAU, 1981).

Dentre as fontes primárias encontram-se também microrganismos como os bolores e leveduras que podem ser pertencentes à própria flora do mel, as quais são introduzidas na colmeia pelas abelhas. Muitos não sobrevivem com os tratamentos térmicos e o aumento da concentração de açúcares, mas outros podem resistir e até se multiplicarem (GOIS, et al., 2010).

As bactérias lácticas são um grupo de bactérias gram-positivas que produzem o ácido láctico mediante a fermentação de carboidratos (ØSTLIE et al., 2003). A presença desse grupo de bactérias lácticas no mel é proveniente de fontes primárias, pois esta bactéria pode ser encontrada no trato digestivo das abelhas *Apis* e ASF. Esse grupo bacteriano desempenha um papel fundamental na produção de mel porque contribui para sua atividade antimicrobiana, por auxiliar na capacidade de inibir o crescimento de ambas as bactérias e fungos, o que garante um efeito positivo sobre o mel (MUHIALDIN et al., 2011; VASQUEZ, 2012).

Os microrganismos de fonte secundária possuem como ponto crítico o contato do apicultor/meliponicultor com o mel e esse momento ocorre logo na colheita, pois é na etapa que se inicia a exposição às condições que podem interferir na qualidade (SILVA et al., 2004). Estes microrganismos interferem negativamente na qualidade do mel, no entanto, sua contaminação pode ser evitada por saneamento padrão e utilização das boas práticas de fabricação durante a colheita e processamento (QUINOÑES-VARQUEZ et al., 2017).

A presença da *Escherichia coli* (enterobactéria), é utilizada como um indicativo de condições higiênicas insatisfatórias, podendo ser contaminação de origem fecal, como se sabe, essa é uma bactéria patogênica aos humanos (FRANCO, LANDGRAF, 2008). É raro identificar esse tipo de contaminação, pois, os tratamentos térmicos e a própria microbiota são capazes de inibir o crescimento desses microrganismos. Alguns tipos de microrganismos desse grupo são associados à intoxicação alimentar devido à formação de

enterotoxinas. Esse tipo de contaminação pode ser fecal ou ambiental devido ao manejo inadequado do mel, com a possível presença de coliformes e *Salmonella spp.* (SHLABITZ, 2010; DÜMEN et al., 2013).

As informações sobre as propriedades antimicrobianas ainda são limitadas, e, apesar de todo potencial que o mel ASF apresenta, existe uma diversidade dessas espécies que ainda não foram investigadas (NISHIO et al., 2014; BUENO-COSTA et al., 2016). O potencial antimicrobiano ainda permanece desconhecido, e devido a isso, estão sendo realizados estudos que pretendem verificar o comportamento dos microrganismos frente aos diferentes tipos de méis e seus constituintes, considerando não apenas a espécie das abelhas, mas, também sua origem botânica (MAVRIC et al., 2008; NISHIO et al., 2014; BUENO-COSTA al., 2016; DASH et al., 2016; CHUTTONG et al., 2016b).

Tendo em vista a complexa composição percebe-se a importância e relevância dos estudos de caracterização do mel para auxiliar a criação de padrão de qualidade, e que, levem em consideração a espécie da abelha, os fatores vegetais e climáticos das respectivas regiões em que são produzidos, garantindo a qualidade do produto a ser consumido e controle de possíveis fraudes (MARCHINI; SOUZA, 2006).

#### 2.4 TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO APLICADO EM MEL

Os métodos de processamento utilizados para o mel de ASF transformam o mel in natura, que possui grande potencial de fermentação, em um produto estável, buscando manter suas características físicas, químicas e sensoriais o maior tempo possível (VILLAS-BÔAS, 2012). Os métodos mais utilizados para a conservação do mel são principalmente: refrigeração, pasteurização e desidratação (CAMARGO et al., 2017). As técnicas de preservação do mel não podem ser consideradas um pré-requisito para o consumo, mas, a aplicação dos tratamentos viabiliza a estocagem para consumo pessoal, familiar ou comunitário e inserção dos méis de ASF no mercado (VILLAS-BÔAS, 2012).

Na indústria de alimentos a refrigeração é um método consagrado para impedir a degradação do produto. Isso acontece em função das baixas temperaturas que dificultam o desenvolvimento de microrganismos. No caso do mel de ASF a refrigeração além de evitar a proliferação de microrganismos também retarda a fermentação (VILLAS-BÔAS, 2012).

A pasteurização é um dos procedimentos mais utilizados em alimentos para destruir microrganismos patogênicos e minimizar a carga microbiológica deteriorante existente, oferecendo ao consumidor um alimento seguro e com vida útil prolongada. Esse processo é considerado um tratamento térmico brando, e no caso do mel, a temperatura não pode exceder 65 °C, o que consiste basicamente no aquecimento e resfriamento rápido do alimento (VILLAS-BÔAS, 2012). É um método prático, porém, pode alterar suas propriedades físicas e químicas, como a formação de 5-HMF. Por esse motivo o mel deve ser monitorado quanto às suas características, para atestar a qualidade do produto (TURHAN et al., 2008).

A desidratação ou desumidificação é um método de processamento bastante conhecido para conservação de alimentos, incluindo o mel. Esse tratamento consiste na diminuição da quantidade de água presente. Para tanto, recomenda-se que o teor de água seja reduzido ao máximo de 20% (ALVES et al., 2011; BILUCA et al., 2014). Essa técnica pode ser mais vantajosa, pois permite uma maior vida de prateleira sendo ainda possível armazená-lo com o teor adequado de umidade, evitando a sua fermentação e garantindo maior durabilidade (SODRÉ et al., 2008). Além disso, pode ser uma excelente alternativa para o meliponicultor como método de conservação do mel com base na praticidade, viabilidade econômica e aceitabilidade (OLIVEIRA et al., 2013).

A maturação é uma técnica de preservação indicada e utilizada por diversos produtores, na qual o mel recém-colhido é fermentado pela microbiota naturalmente presente em sua composição (leveduras osmofílicas) (CAMARGO et al., 2017). A maturação consiste em controlar o processo natural de fermentação que segue a extração do mel, aplicando práticas de higiene e submetendo o produto a um período de maturação que leva em média seis meses. Após esse processo, o mel pode ser mantido em

temperatura ambiente, podendo ser consumido em até dois anos (DRUMMOND, 2013). No mel a maturação que altera as características sensoriais pode ser utilizada para preservação, pois impede o desenvolvimento de patógenos e microrganismos deteriorantes (CAMARGO et al., 2017).

O método ultrassônico é considerado inovador e recentemente vem se destacando como uma metodologia alternativa ao tratamento térmico aplicado pela indústria de alimentos. Esse método inicialmente tinha como objetivo evitar a cristalização, processo que ocorre naturalmente. O método consiste na aplicação de ondas ultrassônicas ao produto que provocam séries rápidas e alternadas de compressão e expansão, que geram forças que podem ser maiores que a tensão superficial que mantém a água, sendo assim, é um método interessante para reduzir a atividade água presente no alimento e reduzir significativamente o desenvolvimento de microrganismos que podem estar presentes no produto (SUBRAMANIAN et al., 2007).

Existem poucas pesquisas relacionadas a esse tipo de tratamento sobre méis de ASF. No entanto, vários pesquisadores estudaram o efeito do ultrassom sobre a qualidade de sucos de pêra, maçã, uva e laranja. Eles observaram que esse método preservou os nutrientes, compostos bioativos, propriedades antioxidantes e atributos sensoriais de cada tipo de fruta. Portanto, é um tratamento alternativo para conservar alimentos e pode ser mais eficaz que os métodos tradicionais (SAEEDUDDIN et al., 2015).

O ultrassom é um processo conhecido devido à sua capacidade de inativar microrganismos e promover a desidratação em alimentos. No mel esse processo é capaz de matar leveduras, retardar a cristalização e possuir destaque por afetar a qualidade do mel em menor grau em comparação com outros processos térmicos. Contudo, a aplicação desse processo exige maior custo, e mesmo possuindo pontos positivos, há poucos estudos que verificam seu potencial benéfico (CHONG et al., 2017).

As chances de granulação aumentam com a diminuição da umidade presente no mel, por isso, o processamento térmico seria uma solução viável. Porém, esses processos podem alterar a qualidade sensorial e contribuir para também eliminar os microrganismos benéficos presentes como, por exemplo,

as bactérias lácticas, conhecidas por terem um efeito benéfico probiótico e diminuir a propriedade antimicrobiana no mel (VASQUEZ, 2012).

O processamento térmico no mel de ASF reduz a acidez da lactona proveniente das bactérias lácticas, reduzindo também a concentração desses microrganismos. Portanto, a termossonicação pode reduzir e até eliminar esse grupo de bactérias, sendo um ponto negativo desta técnica (KOWALSKI, 2013).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DA AMOSTRA

No estudo experimental de abordagem laboratorial, foram analisadas três amostras (A, B e C) de mel de ASF Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*). No meliponário localizado no município de Mandirituba– PR, na coordenada geográfica 25°47'35.1"S 49°17'28.6"W, em março de 2018 no período vespertino e dia ensolarado, foram coletados 840 g e 720 g em duas colmeias distintas para a amostra A e C, respectivamente. No município de São José dos Pinhais– PR nas coordenadas 25°34'27.3"S 49°12'59.0"W, em Abril de 2018 no período matutino em dia ensolarado, foram coletados 840 g de mel de uma colmeia para amostra B.

O delineamento experimental dos tratamentos térmicos e não térmicos foram aplicados nas amostras A e B, e para a vida de prateleira a amostra C foi pasteurizada a 65 °C.

A coleta dos méis foi realizada de acordo com o descrito por Villas-Bôas (2012), mediante escoamento, um método rápido, econômico e prático. Através da tampa de abertura da caixa, os potes de cera foram perfurados com auxílio de um objeto pontiagudo. A caixa foi então inclinada e o mel escorreu para um coador de tecido confeccionado a partir de algodão e poliéster, conhecido popularmente como tecido voal utilizado para separar as sujidades, como pedaços de cerumes ou abelhas. Esse procedimento está ilustrado na Figura 4.

FIGURA 4 - ILUSTRAÇÃO DOS POTES PERFURADOS E O ESCOAMENTO DO MEL



FONTE: Villas-Bôas (2012).

As amostras foram envasadas em potes de vidro previamente esterilizados em autoclave vertical (AV-75 PHOENIX, BRASIL) e após a coleta, foram mantidas em temperatura de  $4 \pm 2$  °C em uma caixa térmica com gelo e transportadas ao laboratório de Tecnologia de Alimentos, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná – Campus Jardim Botânico Curitiba – Paraná.

### 3.2 MATERIAL

Os produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau analítico. Floroglucina, água deionizada, solução tampão pH 4 e 7, fenolftaleína, NaOH 0,1 mol/L, bissulfito de sódio a 0,2%, tampão acetato 1,59 mol.L<sup>-1</sup>, NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, amido 1%, iodo, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, CuSO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, salina peptonada, ágar *Plate Cont Agar*, ágar *De Man Rogosa e Sharpe*, caldo *Lauril Sulfato Tripose*, caldo Tetrionato e Rappaports Vassiliadis, caldo *brain heart in fusion*, ágar e caldo *Sabouraud*, caldo Miller Hinton (CMH), cetaconazol, clorafenicol.

Para a análise de vitaminas hidrossolúveis foram utilizados os padrões de tiamina (B1), riboflavina (B2), nicotinamida (B3), piridoxina (B6), ácido fólico (B9), cobalamina (B12) e ácido ascórbico (C), adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O metanol de padrão HPLC foi adquirido da Merck (DARMSTADT, ALEMANHA) e o ácido trifluoroacético (OHIO, EUA), água ultrapurificada (Milli-Q® Gradient A10 - Millipore (MILFORD, EUA) e água oxigenada (ácido fólico).

#### 3.2.1 Delineamento experimental do tratamento térmico e não térmico aplicado no mel de ASF *M. Mandaçaia*

Para o ensaio dos tratamentos térmicos e não térmicos, as amostras A e B foram fracionadas separadamente em sete porções de 120 g e acondicionadas em potes hermeticamente fechados, esterilizados e previamente identificados. Posteriormente, estas foram submetidas a seis tratamentos independentes como descrito na Tabela 3.

TABELA 3 – TRATAMENTOS TÉRMICOS E NÃO TÉRMICOS APLICADOS NO MEL DA MELIPONA MANDAÇAIA

Amostras	Tratamento	Temperatura (°C)	Tempo
T0	<sup>1</sup> In natura	25± 2,15	0
T1	<sup>1</sup> Desumidificado	30	12 horas
T2	<sup>2</sup> Sonicado	52	30 min
T3	<sup>1</sup> Aquecido	55	1 segundo
T4	<sup>1</sup> Aquecido	65	1 segundo
T5	<sup>1</sup> Maturado	25 ± 4	90 dias
T6	<sup>1</sup> Refrigerado	4 ± 2	304 dias

FONTE: <sup>1</sup>Villas-Bôas, 2012; <sup>2</sup>Chaikham et al., 2016.

Os procedimentos adotados em todos os tratamentos foram aplicados nas amostras A e B. Após cada tratamento, as amostras foram submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas realizadas em triplicata.

#### 3.2.1.1 In natura

Para a amostra controle (T0), as análises foram realizadas no mel após a coleta.

#### 3.2.1.2 Desumidificado

No tratamento T1, as amostras foram acondicionadas em placas de Petri, e mantidas em desidratador de alimentos (EXCALIBUR – 3926T, USA) à temperatura de 30 ± 1 °C por um período de 12 horas (VILLAS-BÔAS, 2012).

#### 3.2.1.3 Sonicado

Para o tratamento T2, as amostras foram vertidas em béquer em temperatura ambiente de 25 °C, e submetidas a ondas ultrassônicas em equipamento ultrassonoro de alta intensidade, (BRANSON MODEL 3510 ULTRA SONICS BATH, GAITHERSBURG) com frequência de 40 kHz até 52 °C, durante 30 minutos e, em seguida, resfriados em água corrente (CHAIKHAM et al., 2016).

#### 3.2.1.4 Aquecido

Os tratamentos T3 e T4 foram realizados a partir de adaptações da metodologia descrita por Villas-Bôas (2012). As amostras foram submetidas a aquecimento mediante banho-maria (DL-BMTD, BRASIL), até atingirem temperatura de 55 e 65  $\pm$  2 °C. As temperaturas foram controladas e medidas com um termômetro digital inserido no centro das amostras. Para atingir as temperaturas desejadas às amostras levaram aproximadamente 10 minutos para 55 °C e 15 minutos para 65 °C, depois de atingidas as temperaturas às amostras foram resfriadas até temperatura ambiente de 25 °C em água corrente.

#### 3.2.1.5 Maturado

No T5, o procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Villas-Bôas (2012), adaptado. As amostras foram mantidas durante 90 dias em estufa (SOLAB SL-74, BRASIL), em ambiente escuro sob temperatura constante de 25 °C. Após 15 dias, a tampa do recipiente foi levemente afrouxada para liberação de gás carbônico, formado pela fermentação natural do mel. Esse procedimento foi repetido semanalmente, até a observação de dois fenômenos que caracterizam a estabilidade do mel: a não formação do gás e a ausência de movimento do colarinho formado pela espuma.

#### 3.2.1.6 Refrigerado

No T6, as amostras A e B foram armazenadas em geladeira convencional com temperatura de 4  $\pm$  2 °C durante 304 dias. Conforme recomendado pela legislação estadual do Paraná (2017).

#### 3.2.2 Ensaio experimental da vida de prateleira do mel ASF *Melipona* Mandaçaia aquecido a 65 °C

O ensaio experimental da vida de prateleira foi conduzido no mel de ASF *M. Mandaçaia* (amostra C), as análises foram realizadas a cada noventa

dias, subsequentemente, durante quatro períodos de estocagem até completar 365 dias, nos tempos: Cin (in natura); C0 (Dia zero aquecido); C90 (90 dias aquecido); C180 (180 dias aquecido); C270 (270 dias aquecido) e C365 (365 dias aquecido).

A amostra, em alíquota de 600 g, foi acondicionada em pote de vidro esterilizado e submetida ao aquecimento a 65 °C em banho-maria (DL-BMTD, BRASIL), por 15 minutos, exceto 120 g da amostra controle (Cin - in natura). Para monitorar a temperatura do processamento, foi utilizado um termômetro no ponto frio – PF (centro da amostra) até atingir a temperatura de 65 °C. Posteriormente, o pote foi imediatamente fechado e submetido ao resfriado em água corrente, conforme mostra a Figura 5.

FIGURA 5 - ETAPAS DO PROCESSO DE AQUECIMENTO A 65 °C



FONTE: Villas-Bôas (2012).

Após o tratamento as amostras foram submetidas ao armazenamento em temperatura ambiente de  $25 \pm 2$  °C. Inicialmente, as amostras Cin (in natura) e C0 (ponto zero aquecido) foram conduzidas às análises físico-químicas e microbiológicas.

### 3.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os ensaios dos tratamentos térmicos e não térmicos e vida de prateleira foram conduzidos mediante a determinação da umidade; sólidos insolúveis em água; cinzas; pH; acidez; atividade de água; hidroximetilfurfural; atividade diastásica; cor; determinação de proteína e determinação de vitaminas hidrossolúveis, realizadas em triplicatas.

### 3.3.1 Umidade

A umidade seguiu o método 925.09, AOAC (2005) mediante a secagem direta de 5 g da amostra em estufa com circulação de ar (Ar SL-102, BR), a 105 °C em pesa-filtro previamente padronizado e mantido até peso constante. O teor de umidade foi obtido a partir da diferença entre a amostra seca e o peso do pesa-filtro. A Equação 1 foi utilizada para o cálculo da determinação de umidade em porcentagem.

$$\text{Umidade(\%)} : \frac{N \times 100}{P} \quad (1)$$

Onde:

$N$  = perda de massa em g;

$P$  = massa da amostra em g.

### 3.3.2 Sólidos insolúveis em água

O teor de sólidos insolúveis realizado por gravimetria foi segundo o método CAC (1990). Para a análise foi pesado 5 g de amostra, homogeneizada em 10 mL de água e a mistura aquecida a 80 °C. Posteriormente, foi utilizado papel filtro previamente preparado e pesado para filtragem da mistura.

Em seguida, foi recolhida parte do filtrado em um béquer, e adicionado algumas gotas da solução de floroglucina e de ácido sulfúrico para verificar a formação de névoa esbranquiçada, prosseguiu a lavagem com água a 80°C até cessar a névoa indicando que o filtrado ficou livre de açúcares.

Após o procedimento, a amostra foi mantida em estufa a 135 °C durante uma hora, na sequência, foi acondicionada em dessecador para redução da temperatura e pesada. Os resultados foram expressos em porcentagem de sólidos insolúveis, conforme a Equação 2.

$$\text{Sólidos Insolúveis (\%)} = \left( \frac{100 \times N}{P} \right) \times 100g \quad (2)$$

Onde:

$N$  = massa seca de sólidos insolúveis em g (diferença de peso no papel);

$P$  = massa da amostragem em g.

### 3.3.3 Cinzas

Para a análise de cinzas utilizou-se o método oficial 923.03 (AOAC, 2005). Foi pesado 5 g de amostra em cadinhos de porcelana previamente tarados. A amostra foi carbonizada em chapa de amianto na capela e incinerada em forno mufla (INDIC- 50, BRASIL), por 6 horas a 550 °C. Após o resfriamento dos cadinhos em dessecador, foi determinado o percentual de cinzas, como descrito na Equação 3.

$$\text{Cinzas (\%)} = \left( \frac{100 \times N}{P} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

$N$  = n° de g de cinzas;

$P$  = n° de g da amostra.

### 3.3.4 pH

Para o potencial hidrogeniônico (pH) foi seguido o método 981.12 descrito na AOAC (2005). Foi diluído 2 g de mel em 50 mL água deionizada em béquer de 100 mL sob agitação magnética. Posteriormente, foi determinado o pH da solução (mel + água) em pHmetro (ANALYSER pH-300, BRASIL), devidamente calibrado com solução tampão pH 4 e 7. O resultado foi expresso em média dos valores obtidos no pHmetro.

### 3.3.5 Acidez total

A determinação da acidez total foi realizada segundo o método 942.15 descrito pela AOAC (2005), alíquotas de 2 g de mel foram diluídas em 50 mL de água deionizada. Foram adicionados três gotas de fenolftaleína 1%, e realizada titulação com solução padronizada de NaOH 0,1 mol/L. O procedimento seguiu até ser observado o ponto de viragem, caracterizado pela visualização da coloração rósea. Mediante a quantidade em volume NaOH gasto para o ponto de viragem, determinou-se o índice de acidez conforme Equação 4.

$$\text{Acidez total} \left( \frac{\text{meq}}{\text{Kg}} \right) = \frac{(V-V_b) \times 50 \times f}{P} \quad (4)$$

Onde:

V = mL da solução de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação;

V<sub>b</sub> = mL da solução de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação do branco;

f = 1,034 fator de correção da solução de NaOH 0,1 mol/L;

P = massa da amostra em g.

### 3.3.6 Atividade de água

A atividade de água (A<sub>w</sub>) foi avaliada por meio da leitura direta em um higrômetro de ponto de orvalho (AQUALAB-DECAGON DEVICES, INC. SERIE 3 MODEL-TE, PULLMAN, WA). Pesou-se 5 g de mel em um recipiente de plástico próprio do equipamento. A leitura foi realizada em temperatura ambiente 25 °C (IAL, 2008).

### 3.3.7 5-Hidroximetilfurfural

O HMF foi determinado de acordo com o método padrão 980.23, AOAC (2005). Foram preparadas as soluções de Carrez I (15g de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O) e solubilizada em 100 mL de água deionizada, em seguida, a solução de Carrez II (30g de Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) foi dissolvida em 100 mL de água deionizada, por fim, foi preparada a solução de bissulfito de sódio a 0,2% (m/v).

Foram pesados 5 g de mel e diluídos em 50 mL de água deionizada, em seguida, adicionou-se 500 µL de cada solução (Carrez I e Carrez II) o volume foi ajustado para 100 mL em balão volumétrico com água deionizada. Após a clarificação da amostra com os reagentes, a solução foi filtrada em papel, descartando os primeiros 10 mL. Em seguida, foi pipetado 5 mL da solução e transferiu-se para 4 tubos de ensaio.

No primeiro tubo foi adicionado 5 mL da solução de bissulfito de sódio, sendo este utilizado como tubo referência, nos outros três tubos foram adicionado 5 mL de água deionizada e identificados como tubos testes. Posteriormente, as soluções foram homogeneizadas e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (UV-1800–SHIMADZU, KYOTO, JAPAN), nos comprimentos

de onda de 284 e 336 nm em cubeta de quartzo. O teor de HMF foi determinado pela Equação 5.

$$HMF \frac{mg}{kg} = \frac{|A_{284} - A_{336}| \times 149,7 \times 5}{P} \quad (5)$$

Onde:

$A_{284}$  = leitura da absorbância a 284 nm;

$A_{336}$  = leitura da absorbância a 336 nm;

P = massa da amostra em g;

5 = massa nominal da amostra;

149,7 =  $(126/16830) \times (1000/10) \times (1000/5)$ .

### 3.3.8 Atividade Diastásica

A determinação da atividade diastásica foi realizada de acordo com o método oficial 958.09 descrito pela AOAC (2005). Para padronizar a solução de iodo ( $0,00035 \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi realizada leitura em espectrofotômetro (METASH UV 5100 UV/VIS, SHANGHAI) em 660 nm, e a amostra diluída em água até o valor atingir  $0,760 \pm 0,02$ , essa solução foi utilizada como referência.

Foi pesado 1 g de mel e diluído em 3 mL de água deionizada, tamponada com 0,5 mL de tampão acetato  $1,59 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 5,3), adicionado 0,3 mL de NaCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e ajustado com o volume para 5 mL com água deionizada, em seguida, foi conduzido juntamente com a solução de amido a 1% em banho a 40 °C.

Após a estabilidade da temperatura, aproximadamente 15 minutos, 2 mL de solução de mel foi misturada em 1 mL de solução de amido 1%, ambos na mesma temperatura. A cada 5 minutos alíquotas de 0,1 mL da mistura foram transferidas para 1 mL da solução de iodo, anteriormente padronizada e realizadas leituras em absorbância de 660 nm até que o valor atingisse 0,235. Posteriormente, com os valores obtidos, foi plotado o gráfico da absorbância versus o tempo. Os resultados foram expressos em unidades Göthe e Shade por grama de mel, determinados de acordo com a Equação 6.

$$\text{Atividade diastásica} = \frac{300}{T_{(x)}} \quad (6)$$

Onde:

$T_{(x)}$  = tempo da reação em minutos.

### 3.3.9 Cor

Para a classificação da cor dos méis foi utilizado o método descrito por Vidal e Fregosi (1984). Foram pesados 2,5 g de mel, adicionados em balão volumétrico e completado o volume para 5 mL com água deionizada. A mistura foi mantida em repouso por 15 min, na sequência, realizada a leitura em espectrofotômetro (METASH UV 5100 UV/VIS, SHANGHAI) a 635 nm, como referência foi utilizada a glicerina. Os valores da cor foram obtidos de acordo com a Equação 7, e interpretados na escala Pfund exposto na Tabela 4.

$$\text{Cor}(mm \text{ Pfund}) = \frac{371,39}{Abs_{635nm}} - 38,70 \quad (7)$$

Onde:

$Abs_{635nm}$  = resultados obtidos das leituras no espectrofotômetro a uma absorbância de 635 nm.

TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO DA ESCALA PFUND

Coloração do mel	Pfund (mm)	$Abs_{635 \text{ nm}}$
Branco-água	$0 \geq 8$	$0,104 \geq 0,125$
Extra branco	$> 8 \text{ a } \leq 16,5$	$> 0,125 \text{ a } \leq 0,148$
Branco	$> 16,5 \text{ a } \leq 34$	$> 0,148 \text{ a } \leq 0,196$
Âmbar extra claro	$> 34 \text{ a } \leq 50$	$> 0,195 \text{ a } \leq 0,238$
Âmbar claro	$> 50 \text{ a } \leq 85$	$> 0,238 \text{ a } \leq 0,333$
Âmbar	$> 85 \text{ a } \leq 114$	$> 0,333 \text{ a } \leq 0,411$
Âmbar escuro	$> 114$	$> 0,411$

FONTE: Marchini et al. (2004).

### 3.3.10 Determinação de proteína

O método 920.87 Micro-Kjeldahl descrito pela AOAC (2005), foi realizado para determinar o conteúdo proteico dos méis. Foi pesado aproximadamente 0,2 g de amostra, acondicionando-se em tubos de digestão

identificados. Em seguida, foram adicionados 2 g da mistura catalítica ( $\text{CuSO}_4$  e  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) e 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Posteriormente, os tubos foram depositados no bloco digestor (DK 20 HEATINGDIGESTER, ITALY) e aquecidos gradativamente até atingir  $400^\circ\text{C}$ .

O bloco digestor foi resfriado após um período de 4 horas em temperatura ambiente e os sólidos diluídos com aproximadamente 10 mL de água destilada. A mistura foi transferida para erlenmeyer de 125 mL, com 5 mL de ácido bórico a 4% e 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila + verde de bromo cresol).

Os tubos foram encaixados no destilador, modelo SOLAB SL-74 de Kjeldahl, e adicionado quantidade suficiente de NaOH 50% até completa alcalinização, dando continuidade a destilação até a obtenção de aproximadamente 50mL de solução nos erlenmeyers. Posteriormente, realizou-se a titulação com a solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,02N até a viragem do indicador visual verde para róseo. Por fim, foi anotado o valor do HCl gasto na titulação e determinado o teor de nitrogênio por meio da Equação 8.

$$\text{Teor de proteína (\%)} = \frac{V \times 0,00028 \times fc \times Fc \times 100}{\text{peso da amostra}} \quad (8)$$

Onde:

V = volume gasto na titulação da amostra - volume gasto na titulação do branco;

fc = fator de correção da solução de ácido sulfúrico (HCl);

Fc = fator de conversão da proteína animal = 6,25.

### 3.3.11 Vitaminas hidrossolúveis

As amostras de mel foram preparadas pesando 2 g de mel em balão volumétrico de 10 mL e adicionando 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M. Após a dissolução, 2,5 mL de tampão fosfato 1 M pH 5,5 completou-se o balão de 10 mL com água ultra purificada (CIULU, et al., 2011). Em seguida, as soluções das amostras foram filtradas com filtros de seringa de PTFE (13 mm e 0,22  $\mu\text{m}$ ).

A determinação das vitaminas hidrossolúveis foi realizada utilizando o sistema de HPLC (AGILENT SÉRIE 1100, CALIFÓRNIA, EUA) acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD), sendo os cromatogramas registrados e analisados através do *software* Agilent Chemstation versão B.04.03. As condições cromatográficas foram realizadas de acordo com a adaptação de Klejdus et al. (2004). A separação foi realizada em coluna com um Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) com respectiva pré-coluna e gradiente de eluição de 0,01% TFA pH 2,9 em água e metanol eluído a um fluxo de 0,7 mL.min<sup>-1</sup> a 25 com 5 de volume de injeção.

A eluição gradiente foi de 5% B durante 0-4 minutos, linearmente aumentada de 5% para 98% B de 4-14 minutos e mantida a 98% B durante 6 minutos, depois de 20-22 minutos a inversão da fase móvel para 5 % B e mantido por 5 minutos. O comprimento de onda de detecção foi de 256 nm para as vitaminas C, B1 e B3; 270 nm para B2 e 280 nm para B6, B9 e B12. A concentração padrão das vitaminas variou de 0,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 3.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As análises microbiológicas para bactérias aeróbio mesófilo, bolores e leveduras, bactérias ácido lácticas (BAL), (UFC/g), coliformes termotolerantes, *Salmonella spp.*, foram realizadas de acordo com as orientações da *American Public Health Association* (APHA), descritas na 4<sup>a</sup> Edição do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001).

Para o preparo da amostra, uma alíquota de 10 g de mel foi diluída em 90 mL de enriquecimento de peptona a 0,1 %, e na sequência, 0,1 mL dessa solução foi semeada em frascos contendo 9 mL solução salina peptonada (SSP), para obterem-se as soluções decimais subsequentes 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>. Em seguida, foram plaqueadas em triplicata.

A contagem de bactérias mesófilas, 0,1 mL das diluições foram plaqueadas em superfície utilizando o meio ágar *Plate Cont Agar* (PCA). Posteriormente, as placas de forma invertida foram incubadas à temperatura ambiente (25 °C) por 24 horas.

Para bolores e leveduras, 0,1 mL das diluições foram semeadas sobre o meio ágar *Sabouraud*, e incubadas a temperatura de 36 °C por 48 horas.

A contagem dos microrganismos do grupo bactérias ácido lácticas (BAL), as diluições foram inoculadas em placas contendo ágar *De Man Rogosae Sharpe* (MRS). Em seguida, as placas de forma invertidas foram acondicionadas em uma jarra de anaerobiose, no qual com o auxílio de um cultivo anaeróbico da marca Anaero Pack® - Anaero foi utilizado para produzir uma atmosfera adequada para o crescimento dos microrganismos. Após o procedimento, as placas foram incubadas a 36 °C, durante cinco dias, e realizada a contagem das colônias.

A análise de coliformes totais utilizou-se o método de fermentação em tubos múltiplos seguindo a ordem em triplicata, onde 1 mL das diluições foram acondicionados em tubos com 10 mL de Caldo *Lauril Sulfato Tripose* (LST), e incubados a 36°C por 24 horas, para a demanda biológica de oxigênio (BOD). O resultado de coliformes foi expresso em números mais provável – (NMP.g<sup>-1</sup>).

Para a pesquisa de *Salmonella spp.*, foi diluído 25 g de mel em 225 mL de água peptonada a 1%, com pré-enriquecimento de caldo lactosado a 35 °C por 24h. Posteriormente, 0,1 mL dessa suspensão foi transferida em 9 mL de caldo seletivo Tetracionato e *Rappaports Vassiliadis*, e incubado em estufa a 35 °C/24 h. Posteriormente, foi semeado uma alíquota de 0,1 mL em ágar SS (*Salmonella Shiguella* e incubado a 35°C/48h).

#### 3.4.1 Atividade antimicrobiana

Para a análise antimicrobiana foi realizada a leitura em microplaca de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo a metodologia *Clinical and Standarts Institute* (CLSI, 2012).

A avaliação da atividade antimicrobiana do mel foi relacionada ao desenvolvimento de duas bactérias *gram*-negativas, *Escherichia coli* ATCC 25922e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, uma bactéria *gram*-positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 25023 (C), e um fungo *Cândida albicans* ATCC 10231 (E).

Para a ativação dos microrganismos, pérolas contaminadas com as cepas foram cultivadas em caldo nutritivo *brain heart in fusion* (BHI), e incubados a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as cepas foram plaqueadas em ágar BHI para as bactérias, e ágar *Sabouraud* para a *C. albicans*, e incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas. Posteriormente, com o auxílio de alças de inoculação descartáveis foram repicadas as colônias das cepas em questão, e suspensas em solução salina 0,85%, obtendo-se uma turbidez equivalente ao tubo 0.5 de McFarland. Então, diluiu-se o mesmo em solução salina 0,85% resultando em uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. As diluições foram plaqueadas no dia das suspensões.

Para a realização do teste foram utilizados microplacas de ELISA de 96 poços fundo na forma de “U” com auxílio de pipetadora multicanal. Para o controle de esterilidade foi adicionado 100 µL em poços da placa (coluna 1 a 12, letras A H) de Caldo Miller Hinton (CMH) para análises com bactérias, e Caldo *Sabouraud* para análise com fungos.

Nos primeiros poços da linha A, foi acrescido 100 µL de mel puro e homogeneizado com o caldo, em seguida, foi transferido 100 µL para os orifícios subsequentes, obtendo-se a diluição seriada em concentrações decrescentes, descartando-se os últimos 100 µL. As concentrações estão descritas na Tabela 5.

TABELA 5 - CORRELAÇÃO COM A PROPORÇÃO DE CALDO PARA MEL, E O INÓCULO BACTERIANO EXPRESSOS EM (µL/mL)

Linha da microplaca	Caldo (µL/mL)	Mel (µL/mL)	Inóculo (µL/mL)
A	50,00	50,00	10,00
B	75,00	25,00	10,00
C	87,50	12,50	10,00
D	93,75	06,25	10,00
E	96,88	03,13	10,00
F	98,44	01,56	10,00
G	99,22	00,78	10,00
H	99,61	00,39	10,00

FONTE: A autora (2019).

Para o controle positivo localizado na coluna 10 da Placa de ELISA, letras A até H, a amostra foi substituída por compostos antimicrobianos, tal

como Clorafenicol em solução hidroalcoólica de etanol a 5%, e o Cetaconazol em solução metanólica a 2%, para inibição de bactérias e leveduras, respectivamente.

Para o controle negativo na coluna 11 da placa de ELISA, letra A até a H, a amostra foi substituída pela solução salina, e por fim na coluna 12, letra A até a H, para o branco o inóculo foi substituído pelo caldo utilizado, CMH para bactérias e *Sabouraud* para o fungo. Foi adicionado 10,00 µL dos inóculos bacterianos.

Após as microplacas serem incubadas por 22 horas a 35 °C foram acrescentados 20 µL de Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5 %, utilizado como indicador para avaliar a atividade antibacteriana, e antifúngica do agente antimicrobiano. As microplacas foram reincubadas a 35 °C por 2 horas. Após 24 horas de incubação, realizou-se a leitura visual, e o resultado foi interpretado determinação do CMI, para a menor concentração de mel, onde a ausência da atividade antimicrobiana houve a coloração vermelha, enquanto a não formação da coloração vermelha foi considerada como presença de atividade. A CIM final foi expressa conforme a porcentagem de inibição do antimicrobiano.

#### 3.4.2 Análise estatística

O *software Statistica* 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) foi utilizado para auxiliar o tratamento dos dados obtidos. Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada tratamento térmico e não térmico aplicado nas amostras de mel. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando houve diferença significativa ao nível de 95% ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ENSAIO EXPERIMENTAL DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS E NÃO TÉRMICOS

#### 4.1.1 Característica físico-química

As características físico-químicas das amostras A e B de mel de *M. Mandaçaia* como a umidade,  $A_w$ , pH, acidez total, conteúdo de 5-HMF, cor, diástase, sólidos insolúveis em água, cinzas e proteínas antes e após os tratamentos aplicados, estão apresentadas na Tabela 6.

O T1 das amostras A e B apresentaram diferença significativa ( $p=0,00$ ) no teor de umidade quando comparado com os demais tratamentos. Fato que pode ser decorrente à exposição do mel ao longo período de aquecimento, 12h a 30 °C, que propiciou a maior evaporação de água.

No entanto, o T0 da amostra A e B que registrou 36,21% e 35,42%, de umidade, respectivamente, foi semelhante a 25,9 a 43,5%, encontrado por Biluca et al. (2016) para mel in natura da ASF de *M. Mandaçaia*. Esse fato pode ser justificado uma vez que o mel de ASF é influenciado pela espécie, origem geográfica e botânica, condições climáticas e estação do ano de colheita do mel (BIJLSMA et al., 2006). Além disso, o T0 (amostra A e B) foi superior aos 35% preconizados pelo estado da Bahia (2014); Amazonas (2016); Paraná (2017), e *Malaysian Standarts* (2017).

Entretanto, os parâmetros preconizados por São Paulo (2017) e Espírito Santo (2019) com o limite de 40% de umidade, são consistentes aos resultados obtidos antes e após os tratamentos térmicos e não térmicos de ambas as amostras. Assim, o parâmetro de 35% de umidade pode não ser ideal para o mel de *M. Mandaçaia* em diferentes locais de produção, considerando todos os fatores influenciáveis, os resultados sugerem tendência de valor de umidade acima do recomendado para mel de *M. Mandaçaia*. Portanto, antes da definição do limite de umidade é recomendável mapeamento do perfil das espécies de ASF em diferentes cenários.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICA FÍSICO-QUÍMICA DO MEL DEMELIPONA MANDAÇAIA ANTES E APÓS OS TRATAMENTOS

Parâmetro	Amostra	Tratamentos térmicos										Valor do P
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6				
Umidade (%)	A	36.21±0.91 <sup>a</sup>	24.47±0.80 <sup>b</sup>	35.49±0.83 <sup>a</sup>	36.05±0.89 <sup>a</sup>	34.92±0.30 <sup>a</sup>	33.12±0.22 <sup>a</sup>	35.96±0.20 <sup>a</sup>	0,00			
	B	35.42±0.49 <sup>a</sup>	23.37±0.29 <sup>b</sup>	34.58±0.59 <sup>a</sup>	34.12±0.07 <sup>a</sup>	34.56±0.15 <sup>a</sup>	36.40±0.13 <sup>a</sup>	36.39±0.14 <sup>a</sup>	0,00			
$A_w$	A	0.74±0.00 <sup>d</sup>	0.60±0.00 <sup>c</sup>	0.79±0.00 <sup>b</sup>	0.79±0.00 <sup>f</sup>	0.77±0.00 <sup>e</sup>	0.78±0.00 <sup>ab</sup>	0.78±0.00 <sup>a</sup>	0,00			
	B	0.79±0.00 <sup>d</sup>	0.63±0.00 <sup>b</sup>	0.78±0.00 <sup>a</sup>	0.82±0.00 <sup>f</sup>	0.78±0.00 <sup>a</sup>	0.77±0.00 <sup>c</sup>	0.80±0.46 <sup>e</sup>	0,00			
pH	A	3.73±0.02 <sup>a</sup>	3.87±0.07 <sup>b</sup>	4.06±0.09 <sup>c</sup>	4.02±0.04 <sup>c</sup>	3.79±0.02 <sup>ab</sup>	2.83±0.02 <sup>d</sup>	3.10±0.01 <sup>e</sup>	0,00			
	B	3.72±0.06 <sup>a</sup>	3.75±0.05 <sup>a</sup>	3.81±0.09 <sup>a</sup>	3.84±0.08 <sup>a</sup>	3.88±0.01 <sup>a</sup>	2.55±0.24 <sup>b</sup>	3.11±0.09 <sup>c</sup>	0,00			
Acidez total (meq.kg <sup>-1</sup> )	A	64.13±0.06 <sup>a</sup>	62.26±0.17 <sup>a</sup>	67.61±0.12 <sup>a</sup>	67.04±0.12 <sup>a</sup>	66.06±0.06 <sup>a</sup>	97.12±0.06 <sup>c</sup>	80.97±0.12 <sup>bd</sup>	0,00			
	B	53.58±0.00 <sup>a</sup>	56.80±0.12 <sup>a</sup>	55.76±0.10 <sup>a</sup>	56.16±0.06 <sup>a</sup>	51.65±0.06 <sup>a</sup>	74.00±0.12 <sup>b</sup>	62.93±0.25 <sup>ab</sup>	0,00			
5-HMF (mg/Kg <sup>-1</sup> )	A	1.10±0.85 <sup>a</sup>	10.13±0.23 <sup>c</sup>	7.88±0.17 <sup>d</sup>	6.24±0.09 <sup>b</sup>	5.59±0.17 <sup>b</sup>	9.28±1.69 <sup>c</sup>	0.80±0.17 <sup>a</sup>	0,00			
	B	3.94±0.23 <sup>a</sup>	14.37±0.52 <sup>b</sup>	19.81±1.75 <sup>c</sup>	20.96±0.45 <sup>c</sup>	11.23±0.40 <sup>d</sup>	14.12±0.31 <sup>b</sup>	2.35±0.31 <sup>a</sup>	0,00			
Cor (mm Pfund)	A	32.93±0.19 <sup>a</sup>	64.69±0.27 <sup>e</sup>	56.10±0.02 <sup>b</sup>	61.15±0.09 <sup>c</sup>	68.59±0.20 <sup>f</sup>	80.08±0.02 <sup>g</sup>	63.21±0.13 <sup>d</sup>	0,00			
	B	55.26±0.13 <sup>a</sup>	70.54±0.06 <sup>e</sup>	58.85±0.06 <sup>b</sup>	63.53±0.35 <sup>c</sup>	67.42±0.09 <sup>d</sup>	113.30±0.13 <sup>g</sup>	75.38±0.19 <sup>f</sup>	0,00			
Diástase (° Göthe)	A	18,94±0,11 <sup>e</sup>	8,37±0,02 <sup>a</sup>	8,66±0,09 <sup>a</sup>	12,65±0,12 <sup>b</sup>	13,08±0,15 <sup>b</sup>	14,57±0,28 <sup>d</sup>	9,89±0,13 <sup>c</sup>	0,00			
	B	17,85±0,02 <sup>f</sup>	9,98±0,01 <sup>b</sup>	6,19±0,18 <sup>a</sup>	12,90±0,30 <sup>d</sup>	10,65±0,21 <sup>c</sup>	14,37±0,02 <sup>e</sup>	6,20±0,16 <sup>a</sup>	0,00			
Sólidos insolúveis em água (%)	A	0.11±0.05 <sup>a</sup>	0.12±0.05 <sup>a</sup>	0.12±0.07 <sup>a</sup>	0.11±0.04 <sup>a</sup>	0.12±0.04 <sup>a</sup>	0.08±0.10 <sup>a</sup>	0.14±0.10 <sup>a</sup>	0,98			
	B	0.19±0.17 <sup>a</sup>	0.17±0.11 <sup>a</sup>	0.16±0.04 <sup>a</sup>	0.13±0.14 <sup>a</sup>	0.13±0.09 <sup>a</sup>	0.11±0.04 <sup>a</sup>	0.17±0.03 <sup>a</sup>	0,97			
Cinzas (%)	A	0.15±0.02 <sup>ab</sup>	0.22±0.02 <sup>c</sup>	0.16±0.00 <sup>bc</sup>	0.11±0.08 <sup>ab</sup>	0.15±0.02 <sup>ab</sup>	0.10±0.01 <sup>ab</sup>	0.09±0.01 <sup>b</sup>	0,00			
	B	0.15±0.01 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>a</sup>	0.15±0.01 <sup>a</sup>	0.14±0.01 <sup>a</sup>	0.16±0.03 <sup>a</sup>	0.18±0.00 <sup>a</sup>	0.14±0.01 <sup>a</sup>	0,16			
Proteína (%)	A	0.62±0.06 <sup>a</sup>	0.90±0.08 <sup>c</sup>	0.69±0.05 <sup>ab</sup>	0.79±0.05 <sup>bc</sup>	0.64±0.04 <sup>ab</sup>	0.89±0.08 <sup>c</sup>	0.60±0.01 <sup>a</sup>	0,00			
	B	0.72±0.05 <sup>b</sup>	1.03±0.10 <sup>c</sup>	0.62±0.09 <sup>ab</sup>	0.59±0.01 <sup>ab</sup>	0.53±0.05 <sup>a</sup>	1.01±0.04 <sup>c</sup>	0.68±0.04 <sup>ab</sup>	0,00			

Tratamentos: T0: in natura; T1: desumificado 30 °C; T2: ultrassom 52 °C; T3: aquecido 55 °C; T4: aquecido 65 °C; T5: maturado 25 °C; T6: refrigerado 4 ± 2 °C;

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias dos tratamentos: teste de Tukey (p<0,05).

O teor de  $A_w$  do mel depende de vários fatores, como, a época da colheita, grau de maturação atingido na colmeia, fatores climáticos, néctar de flores, frutos ricos em água, espécie de ASF (SILVANO et al., 2014; RAMÓN-SIERRA et al., 2015) e aspecto do tratamento térmico que podem afetar o parâmetro (SILVANO et al., 2014).

A  $A_w$  mostrou diferença significativa ( $p=0,00$ ) entre os tratamentos para as amostras A e B quando comparados com o T0. O T1 de ambas as amostras, ocasionou a maior redução da  $A_w$ . Fato que, assim como o ocorrido com teor de umidade, pode ser decorrente à exposição do mel ao longo período de aquecimento, 12h a 30 °C. O valor obtido no T1 é semelhante com 0,63 encontrado para mel de ASF da espécie *Melipona* (Dias et al., 2014). O T5 e T6 (amostra A e B) promoveram aumento da  $A_w$ , menor pH, portanto, maior acidez, resultado semelhante ao obtido por Ribeiro et al. (2018), em mel maturado de *Melipona quadrifasciata*. Isso ocorre devido à fermentação dos açúcares por meio da ação de microrganismos endógenos, gerando produção de ácido com conseqüente redução no pH (FINOLA et al., 2007).

Os valores de pH apresentaram diferença significativa ( $p=0,00$ ) entre os tratamentos para as amostras A e B quando comparados com o T0. Após T1, T2, T3 e T4 (amostra A e B) os valores do pH aumentaram em decorrência dos tratamentos. Efeito semelhante foi observado por Freitas et al. (2010) e Ribeiro et al. (2018) quando analisaram mel de *Subnitida Melipona* e *Melipona quadrifasciata*, respectivamente. Os autores sugerem que o aumento do pH ocorre devido à volatilização dos ácidos orgânicos presentes, em particular a reação dos ácidos voláteis sob o tratamento térmico.

O T5 com valores de 2,83 e 2,55 das amostras A e B, respectivamente, destacaram-se por terem apresentado os menores valores de pH dentre todos os tratamentos aplicados em ambas as amostras, e são consistentes com os valores preconizados para o estado do Paraná (2017), de no Máx 4,7, e por *Malaysian Standarts* (2017), com valores entre 2,5 a 3,8. O pH do T1, T2, T3, T4 e T6 das amostras A e B são consistentes com os valores preconizados nos estados de São Paulo (2017) e Espírito Santo (2019), de 2,9 – 4,5 e no Paraná (2017) de no Máx. 4,7 de pH. O baixo pH das amostras A e B indicam que provavelmente não haverá crescimento microbiano anaeróbico, incluindo o

*Clostridium Botulinum*. O microrganismo não se desenvolve em pH inferior a 4,6, sugerindo assim, que os tratamentos do mel de ASF podem ser considerados seguros para o consumo infantil (WHO, 2018).

O valor da acidez corresponde aos ácidos orgânicos que pode variar de acordo com a composição floral do mel, espécie da ASF, fermentação por microrganismos e posterior oxidação de ácidos carboxílicos (RAMÓN-SIERRA et al., 2015; ÁVILA et al., 2018). O teor de acidez total apresentou diferença significativa ( $p=0,00$ ) no T5 e T6 das amostras A e B, quando comparados aos demais tratamentos.

O aumento da acidez após o T5 nas amostras A e B, como mostrado na Tabela 6, pode estar relacionado à possível fermentação de açúcares em ácidos orgânicos (SANCHO et al., 2013). O tratamento T6 obteve valores maiores de acidez total de 80,97 e 62,93 meq.kg<sup>-1</sup> quando comparado com T0, nas amostras A e B, respectivamente. O resultado do T6 (amostra A e B) foi inferior a 105,1 meq.kg<sup>-1</sup> no mel fresco, e 117,3 meq.kg<sup>-1</sup> após a estocagem de 365 dias em mel de ASF da espécie *T. laeviceps* quando submetido à vida de prateleira, sob a temperatura de 4 °C (CHUTTONG et al., 2016a). Contudo, a acidez pode aumentar quando o mel de ASF é submetido a um longo período de estocagem sob refrigeração, como o obtido no T6.

O teor de acidez encontrado nas amostras A e B não estão em conformidade com o preconizado pelos estados da Bahia (2017), São Paulo (2017), e Espírito Santo (2017) com limite máximo de 50 meq.kg<sup>-1</sup> para mel de ASF. O T1, T2, T3, T4 e T6 da amostra B, estão de acordo com o limite máximo de 60 meq.kg<sup>-1</sup> preconizado no estado do Paraná (2017). Os valores obtidos após os tratamentos, exceto para T5 da amostra A, são consistentes aos 80 meq.kg<sup>-1</sup> sugerido pelo estado da Amazonas (2016), para ASF.

Biluca et al. (2016) registraram valores entre 16,2 e 139,0 meq.kg<sup>-1</sup>, para mel in natura de ASF da espécie *Melipona*, *Scaptotrigona*, *Tetragonisca*, *Tetragona* e *Trigona*, e Chuttong et al. (2016b) registraram valores elevados de acidez total, variando de 440,0 a 592,0 meq.kg<sup>-1</sup> em mel de três espécies de ASF da Tailândia (*Homotrigona fimbriata*, *Tetragona apicalis* e *Tetragona melanoleuca*). Isso leva a crer que o mel de ASF produzido em diferentes regiões apresenta diferença em relação à acidez, assim, é recomendável o

mapeamento dos meliponários em função da vegetação, diferentes cenários, clima, florada e espécie de ASF para definição específica do limite de acidez total.

O conteúdo de 5-HMF pode apresentar uma correlação positiva frente à capacidade antioxidante, por isso pode ser um indicador sensível ao calor e/ou tempo prolongado de estocagem (DE SOUSA et al., 2016; ZHAO et al., 2018). Além disso, o alto teor desses compostos sugere adulteração, como a adição de açúcares simples de fonte externa, sendo assim, o teor de 5-HMF é um parâmetro indicador do frescor e autenticidade do mel (DE SOUSA et al., 2016; PASIAS et al., 2017).

Para o mel de *Apis*, o teor de 5-HMF não pode exceder  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$ , já para mel produzido em regiões tropicais o teor não deve ser superior a  $80 \text{ mg.kg}^{-1}$  (CODEX, 2001). Para o mel de ASF o teor de 5-HMF não pode exceder  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  na Amazônia (2016) e no Paraná (2017), *Malaysian Standarts* (2017) preconizou o valor inferior a  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$ , já nos estados da São Paulo (2017) e Espírito Santo (2019) foi estabelecido o valor de no máximo  $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ , e no estado da Bahia (2014) o valor máximo permitido é de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

O teor de 5-HMF apresentou diferença significativa ( $p=0,00$ ), para ambas as amostras, após a aplicação de todos os tratamentos, conforme a Tabela 6. O T6 (amostra A e B) diminuiu o valor do 5-HMF quando comparados com o T0, e o mel não apresentou granulação após a estocagem sob refrigeração. Portanto, esse fato sugere que as condições de tempo e temperatura no T6 são adequadas para aumentar a vida útil do mel de ASF, sem afetar o teor conteúdo de 5-HMF.

Após os tratamentos o teor de 5-HMF aumentou à medida que as amostras A e B foram submetidas aos T1, T2, T3, T4, e durante o T5. Os resultados estão de acordo com estudos de Chaikhan et al. (2016) e Zhao et al. (2018), quando o mel de *Apis*, apresentou aumento significativo no teor de 5-HMF, após os tratamentos térmicos. Por outro lado, Biluca et al. (2014), mostraram a resistência na formação de 5-HMF em mel de treze espécies de ASF quando submetidos aos tratamentos com altas temperaturas de  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $85$

°C e 95 °C devido à umidade elevada, acidez e predominância de frutose em sua composição.

No T0 o mel obteve valores de 1,10 e 3,94 mg.kg<sup>-1</sup> de 5-HMF nas amostras A e B, respectivamente. Fato que o mel produzido em regiões subtropicais mesmo em temperaturas relativamente baixas, pode elevar o teor de 5-HMF naturalmente durante a maturação e manutenção do mel na colmeia, sem que o mesmo tenha sido submetido a superaquecimento e/ou ter sido adulterado (WHITE et al., 1964; WHITE, 1994; CHUTTONG et al., 2016a).

No entanto, no mel o teor de 5-HMF ocorre pela degradação dos açúcares, como a frutose e principalmente a glicose em meio ácido, formado na reação de *Maillard* (reação de escurecimento não enzimático), além disso, pode estar relacionado ao calor que ocorre durante o tratamento térmico ocasionando o escurecimento na cor do mel, devido à concentração de açúcar e aminoácidos sob condições térmicas (CAN et al., 2015; DE SOUSA et al., 2016).

A conservação da cor do mel se relaciona diretamente com a aceitação comercial desse produto (CHAIKHAM et al., 2016). Na Tabela 6, pode se perceber que os resultados de cor encontrados para mel de *M. Quadrifasciata* apresentaram diferença significativa (p=0,00), decorrente do escurecimento em ambas as amostras após os tratamentos. Os resultados estão em conformidade com o preconizado pelo Codex (CODEX, 2001) para mel de *Apis*, e sugeridos para mel de ASF de acordo com a Tabela 1, com limite de quase incolor a pardo escuro.

Inicialmente, a coloração do mel no T0, amostra A e B, mostraram uma variação de 32,93 mm e 55,26 mm, com cor branco e âmbar claro na escala Pfund, respectivamente. Após os tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5 e T6), a amostra A apresentou valores mínimo de 56 e máximo 80,08 mm Pfund, classificada como âmbar claro, enquanto a amostra B variou de 58,85 e 113,30 mm Pfund, classificada como âmbar claro e âmbar, respectivamente. O T5 foi o que mais teve influencia na variação da cor, gerando maior escurecimento no mel quando comparado aos demais tratamentos, em ambas as amostras. Fato que pode estar relacionado com a decomposição dos açúcares em meio ácido

pela reação de *Maillard* (DE SOUSA et al., 2016), conforme pode ser conferido o valor da acidez na Tabela 6.

O tratamento ultrassônico e aquecido em temperatura baixa, pode minimizar a mudança de cor nas amostras, confirmando Chong et al. (2017) quando realizaram análise de mel de ASF *Kelulut*, após tratamento ultrassônico e aquecido sob 45, 55, 67, 80 e 90 °C. Em méis florais de *Apis* houve escurecimento após os tratamentos térmicos em alta temperatura (90 °C/5 min) quando comparado com o tratamento ultrassônico a 40 kHz. Resultado consistente com o T2 a 40 kHz em que teve a menor alteração da cor quando comparados com os tratamentos térmicos T1, T3, T4 e T6 (CHAIKHAM et al., 2016). A amostra B mostrou-se mais escura que a amostra A, essa diferença pode estar relacionada com a origem botânica, fonte de néctar, conteúdo de pólen e localização geográfica em que o mel foi produzido (ESCUREDO et al., 2014; CAN et al., 2015).

As enzimas diástase ( $\alpha$  e  $\beta$ -amilases) são naturalmente encontradas em mel, provenientes das glândulas hipofaríngeas das abelhas e das plantas, por isso podem ser consideradas parâmetros indicativos de frescor do mel. Além disso, essas enzimas apresentam alto grau de instabilidade frente à temperatura elevada durante tratamentos térmicos, estocagem inadequada e prolongada que resultam em diminuição da atividade diastásica (PASIAS et al., 2017).

A atividade diastásica apresentou diferença significativa ( $p=0,00$ ) após os tratamentos em ambas as amostras. O T1 da amostra A obteve valor de 8,37 na escala Göthe, valor menor ao encontrado no T0 (18,94 °Göthe). Fato que pode estar relacionado ao longo tempo de tratamento térmico que amostra foi submetida, 30 °C por 12 horas (PASIAS et al., 2017). O T2 (amostra A e B) obteve resultado semelhante ao encontrado no estudo de Chaikham et al. (2016), no qual o mel de *Apis* foi submetido a tratamento ultrassônico (20 kHz com 40% de amplitude) por 30 min, o tratamento diminuiu a atividade diastásica de 13,87 - 15,12 para 9,69 – 13,5 °Göthe.

As amostras A e B submetidas ao T6 apresentaram resultados estatisticamente significativos ( $p=0,00$ ), tanto no tempo de estocagem de 365 dias quanto na temperatura de 4 °C, que variou de 9,89 e 6,20 °Göthe,

respectivamente. Esses valores que revelaram significativa queda da diástase quando comparados com T0 (17,85 °Göthe), e são consistentes com o declínio da atividade diastásica no mel da *T. laeviceps* (Chuttong et al. (2016a).

No entanto, ambas as amostras apresentaram valores superiores ao máximo de 3 na escala de Göthe, sugerido para mel de ASF (BAHIA, 2014; AMAZONAS, 2016). Em contraste, a atividade diastásica de todos os méis após os tratamentos térmicos e não térmicos apresentaram valores na faixa padrão de no máximo de 40 na escala de Göthe, preconizado para mel de ASF (PARANÁ, 2017) e mínimo de 8 °Göthe (IHC, 2009), valor preconizado para o mel de abelha *Apis*. Contudo, o T3, T4 e T5 (amostra A e B), apresentaram as melhores condições de tempo e temperatura para evitar danos à qualidade da atividade diastásica, conforme Tabela 6.

O teor de sólidos insolúveis corresponde às impurezas no mel, como resíduos de cera, grãos pólen, fragmentos das abelhas, além de outros elementos inerentes ao mel como o processamento que foi submetido (BRASIL, 2000; SILVA, 2015). O teor de sólidos insolúveis em água não apresentou diferença significativa nas amostras A ( $p=0,98$ ) e B ( $p=0,97$ ). Os resultados da amostra B submetidos ao T1, T2, e T6 excederam o valor de no máximo de 0,1% de sólidos insolúveis em mel de ASF preconizados nos estados da Bahia (2014), Amazonas (2016), São Paulo (2017), Paraná (2017) e Espírito Santo (2019). Em contrapartida, a amostra A submetida aos tratamentos térmicos e não térmicos estão em conformidade ao preconizado para sólidos insolúveis em mel de ASF de no máximo 0,1% de, conforme a Tabela 1.

A quantidade de cinzas ou resíduo mineral é um indicador de pureza do mel. No entanto, quando o valor detectado é acima de 0,5% (IHC, 2009), limite máximo recomendado para mel de *Apis mellifera*, é possível determinar irregularidades como à falta de higiene, decantação e/ou filtração do mel no final do processo de coleta pelo produtor (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2005). Os dados apresentados na Tabela 6 mostram que os tratamentos não interferiram no teor de cinzas, exceto na amostra A que apresentou diferença significativa ( $p=0,00$ ) no T1.

Os resultados estão de acordo com o limite de 0,6% preconizado nos estados da Bahia (2014) Amazonas (2016), São Paulo (2017), Espírito Santo (2019), 0,8% para o estado do Paraná (2017) e de 1,0% proposto por *Malaysian Standarts* (2017), para o mel de ASF. Os tratamentos apresentaram valores abaixo de 0,5% recomendados para o mel de *Apis Mellifera* (IHC, 2009). No entanto, quando o mel de ASF foi submetido ao T1, tratamento de maior exposição e temperatura, produziu maior redução no teor de água e consequente aumento da concentração de cinzas.

No estudo desenvolvido por Chuttong et al. (2016a) o mel de ASF *T. laeviceps* foi submetido à refrigeração ( $4 \pm 2$  °C) por 365 dias de estocagem, e obteve redução no valor de cinzas de 0,44% para 0,42%, resultado que corrobora com a redução de cinzas após T6 nas amostras A e B, como mostrado na Tabela 6. O teor de cinzas correlaciona-se com o conteúdo mineral e pode ser influenciado pela composição do néctar das plantas que também absorvem do solo contaminantes inorgânicos mediante o ar, assim como em néctar de plantas urbanas e/ou pesticidas (FELSNER et al., 2004; MONIRUZZAMAN et al., 2014). Contudo, o resultado do presente estudo sugere que o mel de *M. quadrifasciata* de ambas as amostras são de procedência segura.

O teor de proteína no mel está associado à presença de pólen, néctar das flores e as enzimas introduzidas pelas abelhas durante o processo de amadurecimento do mel (HABIB et al., 2014; ABU BAKAR, et al., 2017). Esse parâmetro serve como indicador de frescor já que o seu conteúdo pode estar reduzido ou ausente em mel adulterado, superaquecido ou armazenado por longos períodos (NORDIN et al., 2018). As menores concentrações de proteína encontradas no mel de ASF foram após aplicação do T2, T3, T4 e T6 (amostra A e B), exceto para T1 e T5 que aumentou os valores e mostrou diferença significativa ( $p=0,00$ ), quando comparados com T0, respectivamente. A diferença dos valores do T0 entre as amostras A e B, pode estar relacionada à origem botânica distinta da coleta do mel. Não existe regulamento ou legislação em termos de conteúdo de proteínas do mel de ASF, parâmetro necessário para a rotulagem desse produto.

#### 4.1.2 Identificação e quantificação das vitaminas hidrossolúveis do mel de Mandaçaia antes e após os tratamentos térmicos

Na Tabela 7 são descritos os resultados das vitaminas identificadas, ácido nicotínico (B3an) e nicotinamida (B3n), onde a soma dos valores mensurados para cada um desses vitâmeros resultam no total de niacina, ou seja, vitamina B3, e a quantificação da vitamina B9. Na Tabela 7, pode ser visualizada a porcentagem da Ingestão diária recomendada *Recommended Dietary Allowance* (RDA) (IOM, 1994), correspondente as vitaminas identificadas nas amostras de mel A e B nos tratamentos.

Comparando o teor de vitaminas B3 entre os tratamentos, podemos considerar que houve diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) nas amostras A e B. Foi possível observar que o T4 da amostra A e B obtiveram os maiores valores de B3 com 2,27 e 4,09  $\text{mg} \cdot 100^{-1}$ , respectivamente, comparado aos demais tratamentos. Em contrapartida, o T6 revelou os menores valores de B3 na amostra A 1,29  $\text{mg} \cdot 100^{-1}$  e na B com 2,75  $\text{mg} \cdot 100^{-1}$ .

TABELA 7 - VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO

Amostra $\Delta$	B3an (ácido nicotínico)		B3n (nicotinamida)	Vitamina B3	B3 (mg/20g)	*% RDA /20g mel	B9 (ácido fólico)	B9 (mg/20g)	*% RDA /20g mel
	(mg.100g <sup>-1</sup> )	(mg.100g <sup>-1</sup> )							
T0	1,13±0,05 <sup>a</sup>	0,69±0,03 <sup>cd</sup>	1,82±0,03 <sup>ab</sup>	0,36	2,25	ND	-	-	
T1	1,33±0,14 <sup>a</sup>	0,92±0,09 <sup>ab</sup>	2,25±0,12 <sup>a</sup>	0,45	2,81	ND	-	-	
T2	1,10±0,07 <sup>a</sup>	1,01±0,02 <sup>b</sup>	2,11±0,06 <sup>a</sup>	0,42	2,63	ND	-	-	
T3	1,11±0,15 <sup>a</sup>	0,98±0,04 <sup>ab</sup>	2,09±0,10 <sup>a</sup>	0,42	2,63	ND	-	-	
T4	1,45±0,05 <sup>a</sup>	0,82±0,05 <sup>ad</sup>	2,27±0,02 <sup>a</sup>	0,45	2,81	ND	-	-	
T5	1,41±0,06 <sup>a</sup>	0,58±0,02 <sup>c</sup>	1,99±0,08 <sup>a</sup>	0,4	2,50	ND	-	-	
T6	1,03±0,37 <sup>a</sup>	0,26±0,11 <sup>e</sup>	1,29±0,48 <sup>b</sup>	0,26	1,63	ND	-	-	
p	0,05	0,00	0,00	-	-	-	-	-	
Amostra $\square$									
T0	1,48±0,08 <sup>a</sup>	1,88±0,06 <sup>a</sup>	3,36±0,13 <sup>ab</sup>	0,67	4,19	1,29±0,25 <sup>d</sup>	0,26	108,33	
T1	1,21±0,05 <sup>c</sup>	1,51±0,11 <sup>c</sup>	2,72±0,16 <sup>d</sup>	0,54	3,38	0,41±0,03 <sup>bc</sup>	0,08	33,33	
T2	1,55±0,02 <sup>ab</sup>	1,78±0,04 <sup>ac</sup>	3,33±0,03 <sup>a</sup>	0,67	4,19	0,75±0,07 <sup>ab</sup>	0,15	62,50	
T3	1,71±0,10 <sup>b</sup>	2,04±0,05 <sup>ab</sup>	3,75±0,13 <sup>bc</sup>	0,75	4,69	0,89±0,13 <sup>a</sup>	0,18	75,00	
T4	2,16±0,04 <sup>d</sup>	1,93±0,05 <sup>ab</sup>	4,09±0,07 <sup>c</sup>	0,82	5,13	0,75±0,16 <sup>ab</sup>	0,15	62,50	
T5	1,50±0,08 <sup>a</sup>	2,21±0,06 <sup>b</sup>	3,71±0,12 <sup>bc</sup>	0,74	4,63	1,09±0,02 <sup>ad</sup>	0,22	91,67	
T6	1,69±0,02 <sup>b</sup>	1,06±0,22 <sup>d</sup>	2,75±0,24 <sup>d</sup>	0,55	3,44	0,30±0,06 <sup>c</sup>	0,06	25,00	
p	0,00	0,00	0,00	-	-	0,00	-	-	
RDA/dia	(16,00 mg adulto)		(240 µg adulto)						

Tratamentos: T0: in natura; T1: desumidificado 30 °C; T2: ultrassom 52 °C; T3: aquecido 55 °C; T4: aquecido 65 °C; T5: maturado 25 °C; T6: refrigerado 4 ± 2 °C;

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05);

RDA = Ingestão diária recomendada expressa em % (IOM, 1994);

\*RDA = Para o cálculo do percentual foi considerado uma porção de 20 g de mel (BRASIL, 2003);

ND = Não detectado.

O consumo de 20 g de mel de *M. quadrifasciata* representa 2,81% da vitamina B3 quando submetido ao T1 e T4 (amostra A), e para amostra B o T3 e T4 com 4,69 e 5,13%, respectivamente, apresentando valores superiores quando comparados com o T0 de ambas as amostras. Para a vitamina B9 após os tratamentos térmicos, o T5 apresentou 91% do consumo diário necessário de B9 em 20 g de mel. Sendo assim, a diferença do aporte geral percentual da RDA é necessária uma alimentação variada e saudável para os complementos dos vitâmeros B3 e B9.

Além disso, a determinação de vitaminas em alimentos é muitas vezes uma tarefa desafiadora devido à sua instabilidade. As condições em que o mel pode ser submetido como o envelhecimento, armazenamento, exposição à luz, umidade, pH e temperatura de processamento causam perda de vitamina (LEŠKOVÁ et al., 2006). Um fato que parece contraditório, que ocorreu no T4 (amostra A e B) que causou a concentração da vitamina B3 quando comparado ao T0, isso leva a crer que o tratamento foi eficiente e não causou perdas da vitamina B3.

Verificando a concentração da vitamina B9, a análise de determinação revelou que na amostra A não continha ácido fólico suficiente para ser quantificado. Já a amostra B, apresentou diferentes concentrações de B9 após os tratamentos, mostrando maior concentração no T5 com  $1,09 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , e a redução significativa no T6 com  $0,30 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ . Ciulu et al. (2011), sugerem que a origem botânica influencia significativamente no conteúdo de vitaminas disponíveis no mel, fato que possa justificar a divergência na composição de B9 das amostras A e B, por terem sido produzidas em lugares diferentes. Outro fator que causa perda de vitaminas no mel pode estar relacionado ao manejo do mel após a coleta, tal como a filtração para comercialização do produto, que pode reduzir o conteúdo vitamínico devido à remoção quase completa do pólen (CIULO et al., 2011).

A ingestão diária recomendada (RDA) (BRASIL, 2005 para niacina (B3) e ácido fólico (B9), é de 16 mg/dia e 240  $\mu\text{g}$ /dia, respectivamente. Ao analisar as amostras A e B, percebe-se uma alta porcentagem desses compostos, que ultrapassam o estabelecido. Para o cálculo do percentual da RDA foi considerada uma porção de 20 mg/dia de mel.

#### 4.1.3 Contagem microbiológica

A análise microbiológica avaliou a eficiência dos tratamentos térmicos na redução da carga microbiana e o efeito na manutenção da bactéria ácido láctica (BAL) do mel de *M. Mandaçaia*, conforme pode ser visualizado na Tabela 8.

TABELA 8 - VALORES DA LETALIDADE PARA BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA, AERÓBIO MESÓFILO, BOLORES E LEVEDURAS, COLIFORMES TOTAIS, E. COLI, E SALMONELLA SPP. NO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO

Microorganismo	Bactéria ácido láctica (Log <sup>10</sup> CFU.g <sup>-1</sup> )		Bactéria aeróbio mesófilo (Log <sup>10</sup> CFU.g <sup>-1</sup> )		Bolors e leveduras (Log <sup>10</sup> CFU.g <sup>-1</sup> )		Coliformes totais (NMP/g)		Escherichia coli (NMP/g)		Salmonella spp., (25g)	
	A	B	A	B	A	B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B
T0	5,68±0,58 <sup>b</sup>	5,49±0,63 <sup>d</sup>	5,28±0,77 <sup>b</sup>	4,93±0,80 <sup>d</sup>	5,50±0,43 <sup>e</sup>	4,94±0,31 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	Ausente
T1	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	3,93±0,70 <sup>ab</sup>	2,74±0,40 <sup>a</sup>	2,63±0,53 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	Ausente
T2	5,60±0,68 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	4,14±0,77 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	4,72±0,40 <sup>de</sup>	2,57±0,85 <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	Ausente
T3	5,15±0,62 <sup>bc</sup>	4,47±0,33 <sup>c</sup>	4,62±0,65 <sup>ab</sup>	3,49±0,70 <sup>ab</sup>	4,49±0,59 <sup>cd</sup>	4,80±0,18 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	Ausente
T4	4,30±0,58 <sup>c</sup>	3,79±0,60 <sup>b</sup>	4,57±0,80 <sup>ab</sup>	3,30±0,60 <sup>ab</sup>	2,83±0,75 <sup>ab</sup>	3,91±0,75 <sup>c</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	Ausente
T5	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	3,43±0,76 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>c</sup>	2,91±0,50 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	Ausente
T6	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	3,19±0,46 <sup>a</sup>	4,00±0,31 <sup>cd</sup>	3,90±0,47 <sup>bc</sup>	4,18±0,34 <sup>ac</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	Ausente
p	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00						

Tratamentos: T0: in natura; T1: desumidificado 30 °C; T2: ultrassom 52 °C; T3: aquecido 55 °C; T4: aquecido 65 °C; T5: maturado 25 °C; T6: refrigerado 4 ± 2 °C;

ND: não detectado;

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05).

A faixa de  $A_w$  para o desenvolvimento de microrganismo depende da classe. Para fungos é em torno de 0,70, 0,80 para leveduras e 0,90 para bactérias (GLIETER et al., 2006). Logo, as amostras de ASF da espécie *M. quadrifasciata* submetidas aos diferentes tratamentos térmicos e não térmicos que registram  $A_w \leq 0,80$ , sugerem ser seguras em relação ao crescimento de leveduras e bactérias. Os T2, T3, T4, T5, e T6 apresentaram valores de  $A_w > 0,70$  e são suscetíveis ao desenvolvimento de fungos, no entanto, os resultados das análises microbiológicas apresentados na Tabela 8 demonstram que os méis das amostras A e B são seguros para o consumo humano.

As bactérias do ácido láctico (BAL) encontradas no mel provenientes do intestino das abelhas têm efeito benéfico ao indivíduo devido ao alto potencial probiótico e antimicrobiano (QUINOÑES-VARQUEZ et al., 2017). Com isso, é importante que a BAL seja mantida após o tratamento aplicado no mel, uma vez que, sua presença preserva as qualidades nutricionais e inibe a deterioração do produto mediante ação sobre as bactérias patogênicas (HASALI et al., (2015).

As amostras A e B apresentaram médias 5,68 e 5,49  $\text{Log}^{10}$  CFU/g, respectivamente, de BAL no T0, que sugere procedência segura dos méis. Os tratamentos com o menor impacto sobre a BAL foram os T2, T3 e T4, com divergência no T2, que registrou 5,60  $\text{Log}^{10}$  UFC/g (amostra A) e 0,00  $\text{Log}^{10}$  UFC/g (amostra B). As BAL são pertencentes ao grupo de bactérias gram-positivas que são mais resistentes que as gram-negativas, em razão da parede celular mais espessa, o que proporciona uma melhor proteção contra os efeitos do tratamento ultrassônico (SUHARTATIK et al., 2014).

Vale ressaltar que a resistência de diferentes microrganismos depende de fatores como as propriedades do meio, parâmetros do processo (ZINOVIADOU et al., 2015), e/ou a possível diferença da procedência do mel, o que pode justificar a redução total da BAL na amostra B. No entanto, os tratamentos T1, T5 e T6, eliminaram as BALs, em ambas as amostras.

A presença de bactérias mesófilas, dos bolores e das leveduras está relacionada com a deterioração dos alimentos (OLIVEIRA et al., 2013). Na contagem de aeróbios mesófilos, disposto na Tabela 8, foi possível notar diferença significativa ( $p=0,00$ ) entre os tratamentos na amostra B.

Embora, o T1, T5 e T6, das amostras A e B, tenham resultado na redução da contagem bacteriana de aeróbio mesófilo,  $\pm 1,77$ ,  $\pm 3,39$  e  $\pm 3,02$  Log<sup>10</sup>, respectivamente, eliminaram as BALs.

Após a aplicação de T2 nas amostras A e B, houve a redução dos mesófilos com menores valores que o T3 e T4. Janghu et al. (2017), identificaram menores contagens de bactérias mesófilas após o mel sonicado, quando comparado com processamento térmico a 65 °C, que corrobora com os resultados obtidos na Tabela 8.

No mel de ASF a presença de bolores e leveduras está associada com a alta umidade e devido à sua microbiota que é rica em fungos. No entanto, não há relatos que pela ingestão de mel ocorra doenças causadas por esses microrganismos. Porém, um dos fatores negativos que pode causar a presença desses microrganismos é a fermentação do mel que reduz sua vida útil (GRABOWSKI; KLEIN, 2017). Após o T1 e T5, amostras A e B, foi verificada a redução desses microrganismos no mel, dessa forma, os resultados obtidos estão de acordo com os parâmetros microbiológicos recomendados para o mel de ASF (BAHIA, 2014; AMAZONAS, 2016; SÃO PAULO, 2017; PARANÁ, 2017; ESPÍRITO SANTO, 2019) e para o mel de *Apis mellifera* (BRASIL, 2001).

Em contrapartida, o T1 e T5 (amostra A e B) eliminaram as BALs que são consideradas bactérias benéficas à saúde humana, e, portanto, desfavorável após os tratamentos. No entanto, pode-se notar que os parâmetros microbiológicos preconizados pela legislação para mel de *Apis* são incompatíveis aos parâmetros obtidos no mel de ASF, tornando as comparações inadequadas (VIT et al., 1994; ODDO et al., 2008; MONIRUZZAMAN et al., 2014; BILUCA et al., 2016; CHUTTONG et al., 2016b).

As análises de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, indicaram ausência desses microrganismos na composição das amostras A e B. Os tratamentos térmicos e não térmicos aplicados no mel de *M. Mandaçaia* indicaram que os melhores resultados obtidos foram T1 e T5 sendo eficazes na redução da contagem total de bactérias aeróbio mesófilo, bolores e leveduras. No T1, devido à redução da atividade água que cria um ambiente inóspito para a proliferação desses microrganismos e no T5 pode ter sido pela influencia do pH baixo, que contribuiu para as propriedades inibitórias sob o crescimento

microbiano no mel (ADADI; OBENG, 2017). Em contrapartida, houve a destruição das bactérias lácticas nos respectivos tratamentos em ambas as amostras.

Os valores das bactérias aeróbios mesófilos após os tratamentos estão de acordo com o padrão preconizado pela legislação Código Alimentar Argentino (CAA, 1998), que tem nível máximo permitido de  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  para subprodutos de origem animal, o que confere segurança alimentar no consumo dos méis. Assim, pode se notar que os tratamentos térmicos e não térmicos foram eficazes na redução de aeróbio mesófilo nas amostras A e B.

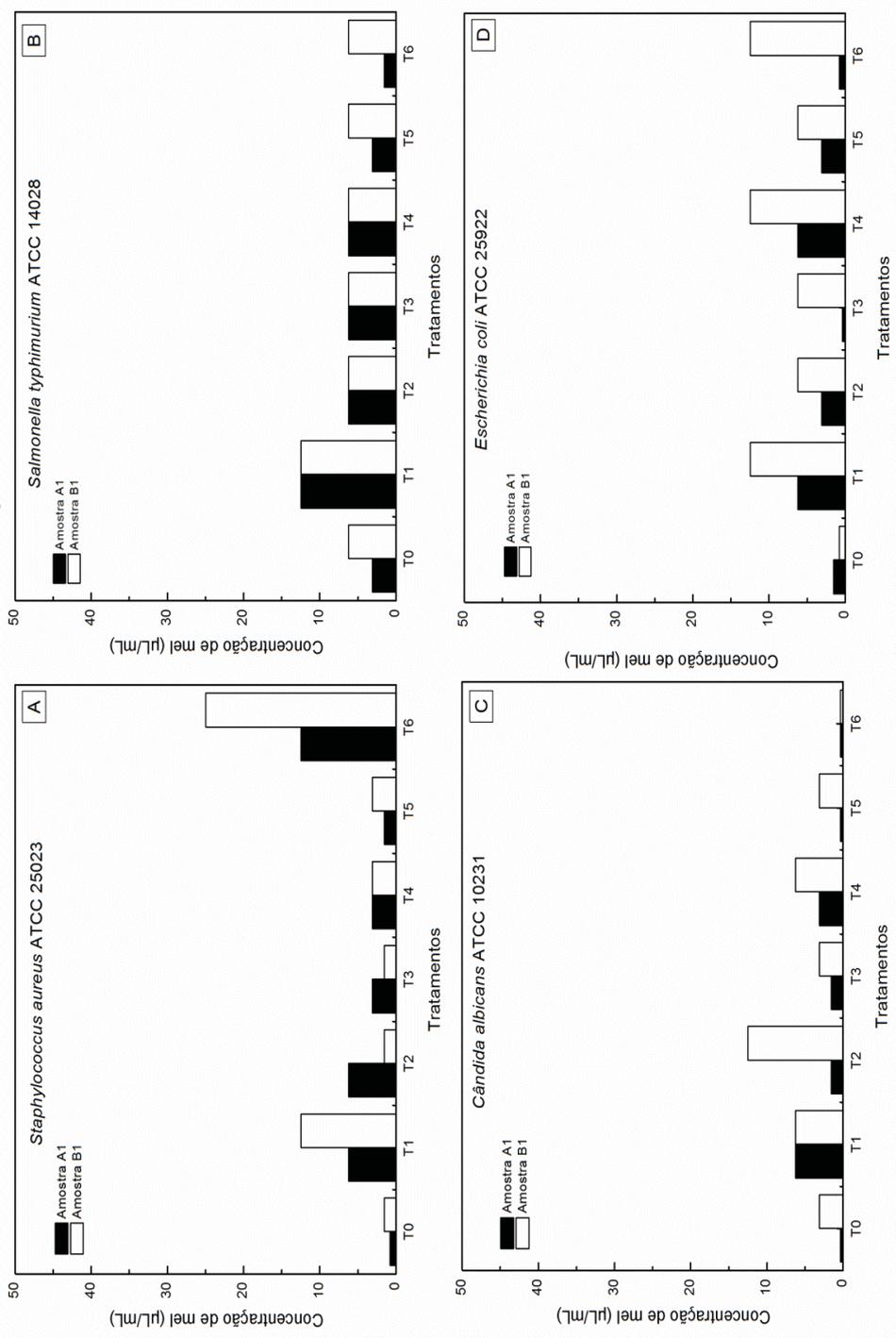
Os resultados sugerem que os tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram eficácia sobre a redução dos microrganismos deteriorantes e não ocasionaram danos as BALs. O método de T4 resultou em menor sobrevivência de aeróbio mesófilo, bolores e leveduras devido à temperatura elevada.

Assim, pode-se dizer que os tratamentos T2, T3 e T4, aplicados ao mel reduziram as bactérias mesófilas e mantiveram as BALs, microbiota benéfica do mel.

#### 4.1.4 Atividade antimicrobiana do mel de Mandaçaia após os tratamentos térmicos

Para avaliar a atividade antimicrobiana foram considerados os valores de CIM concentração ( $\mu L/mL$ ) de mel de *M. Mandaçaia*, necessários para inibir os microrganismos *S. aureus*, *C.albicans*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, respectivamente (Figura 6).

FIGURA 6 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA SUBMETIDO AO TRATAMENTO TÉRMICO



FONTE: a Autora (2019);

Tratamentos: T0: in natura; T1: desumidificado 30 °C; T2: ultrassom 52 °C; T3: aquecido 55 °C; T4: aquecido 65 °C; T5: maturado 25 °C; T6: refrigerado 4 ± 2 °C.

Na avaliação de inibição do *S. aureus*, para a amostra A, foram encontrados mínimos e máximos de CIM de 0,78 e 12,5  $\mu\text{L/mL}$ , T0 e T6, respectivamente. Para a amostra B, os valores obtidos foram de 1,56 para T0, T2 e T3 e 25  $\mu\text{L/mL}$  para T6, conforme mostra a Figura 6A. Em ambas as amostras o mel in natura foi o que mostrou maior eficiência para inibição da cepa, uma vez que, foram necessárias menores concentrações de mel quando comparado aos demais tratamentos. Os testes realizados por Nishio et al. (2014), mostraram que as cepas de *S. aureus* foram sensíveis quando submetido ao mel de *M. Mandaçaia*, com CIM de 2,5  $\mu\text{L/mL}$ .

O *S. aureus* é o microrganismo mais resistente à ação antimicrobiana do mel de *meliponíneos* (DARDÓN; ENRÍQUEZ, 2008; BOORN et al., 2010, BORSATO et al., 2013). Assim, para manter atividade antimicrobiana o ideal seria dispensar o tratamento térmico do mel de ASF. O T5 foi mais eficiente na inibição do *S. aureus* dentre os tratamentos aplicados ao mel para a amostra A, provavelmente esse fato pode estar relacionado a acidez que aumentou após a submissão do T5. Na amostra B os tratamentos que ocasionaram o aumento da acidez, T2 e T3, também foram mais eficientes na inibição deste microrganismo com CIM de 1,56 $\mu\text{L/mL}$ . De acordo com Santos et al. (2007), o pH ótimo de crescimento do *S. aureus* é de 7, fato que justifica a maior inibição devido os tratamentos que ocasionaram redução no pH do mel.

Para *Salmonella typhimurium* os tratamentos T0, T5 e T6, aplicados na amostra A, mostraram maior potencial antimicrobiano com CIM 3,13, 3,13 e 1,56  $\mu\text{L/mL}$ , respectivamente. Na amostra B, todos os tratamentos apresentaram a CIM de 6,25  $\mu\text{L/mL}$ , exceto para T1 que foi preciso 12,5  $\mu\text{L/mL}$  de mel para inibir a cepa. Contudo, para garantir a segurança na inibição da *Salmonella typhimurium*, sugere-se e seja utilizado 12,5  $\mu\text{L/mL}$  de mel de *M. Mandaçaia*, de ambas as amostras, A e B.

Para *C. albicans* o T0, T5 e T6 (amostra A), exerceram maior potencial de inibição, no qual foram encontrados os menores valores de CIM 0,39  $\mu\text{L/mL}$ , enquanto para a amostra B o T6 obteve a menor CIM, também de 0,39  $\mu\text{L/mL}$ . Em ambas as amostras, foi possível perceber que a refrigeração, T6, se mostrou um processo eficaz para inibição do microrganismo. Segundo Silva Neves et al. (2006), a temperatura ótima de crescimento da *C. albicans* é de 30

°C, assim, percebe-se que a refrigeração reduz consideravelmente o crescimento desse microrganismo, justificando os melhores valores para T6.

A análise de *E. coli* mostrou o CIM do T0 com 1,56 e 0,78 µL/mL, das amostras A e B, respectivamente, sugere maior inibição do crescimento da cepa, seguido do T2, T3, T5 e T6 (amostra A), e T2, T3 e T5 (amostra B). Assim, os ensaios de diluição do mel em microplacas, revelaram que todas as amostras de mel inibiram o crescimento de microrganismos *gram-negativo* e *gram-positivo* de maneira dependente da concentração e tratamento térmico aplicado ao mel de ASF. Esses resultados são compatíveis com Nishio et al. (2014), que avaliaram a atividade antibacteriana do mel de abelha *M. Mandaçaia* em cepas de *S. aureus*, *Salmonella* entérica, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Após os tratamentos aplicados nas amostras A e B o T2, T3 e T5 apresentaram os melhores valores de CIM, conforme Figura 6.

É possível observar que os microrganismos testados foram sensíveis as amostras A e B nas concentrações testadas, antes e após os tratamentos térmicos. Para T0 (amostra A e B) foi necessário a menor concentração de mel de *M. quadrifasciata* para inibir as cepas testadas. Esse fato pode estar relacionado à possibilidade do mel possuir diferentes microrganismos, e pode estar ocorrendo à competição entre eles. Assim, esse mecanismo pode evitar a propagação de patógenos, tipicamente com os benéficos (RAMOS et al., 2013).

De modo geral, em ambas as amostras A e B, para garantir a segurança na utilização do mel de *M. Mandaçaia* como agente antimicrobiano, foi necessário utilizar a CIM de 25,00µL/mL de mel para inibir *S. aureus*, *Salmonella*, *C. albicans* e *E. coli*. Além disso, vale ressaltar que o T5 (amostra A e B) com CIM máximo de 6,25 µL/mL, pode ser considerado uma alternativa viável, de baixo custo e ecologicamente sustentável para ser utilizado como antibióticos.

## 4.2 ENSAIO EXPERIMENTAL DE VIDA DE PRATELEIRA

### 4.2.1 Característica físico-química

Na Tabela 9 estão dispostos os parâmetros físico-químicos de umidade, atividade de água, pH, acidez total, 5-HMF, cor, atividade diastásica, sólidos insolúveis em água, cinzas e proteínas, antes e após o aquecimento em temperatura de 65 °C sob o mel de ASF da espécie *Melipona quadrifasciata* avaliados em 5 períodos até totalizar 365 dias.

TABELA 9 - CARACTERÍSTICA FÍSICO-QUÍMICA DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA AQUECIDO A 65 °C

Parâmetro	Vida de prateleira						p
	Cin	C0	C90	C180	C270	C365	
Umidade (%)	39,11±0,06 <sup>b</sup>	34,82±0,07 <sup>a</sup>	34,52±0,04 <sup>a</sup>	36,20±0,09 <sup>ab</sup>	36,71±0,07 <sup>ab</sup>	35,87±0,06 <sup>a</sup>	0,00
A <sub>w</sub>	0,80±0,00 <sup>a</sup>	0,78±0,00 <sup>a</sup>	0,78±0,00 <sup>a</sup>	0,79±0,02 <sup>a</sup>	0,79±0,02 <sup>a</sup>	0,79±0,01 <sup>a</sup>	0,34
pH	3,74±0,01 <sup>e</sup>	3,64±0,00 <sup>d</sup>	3,32±0,00 <sup>c</sup>	2,95±0,00 <sup>b</sup>	2,81±0,01 <sup>a</sup>	2,80±0,01 <sup>a</sup>	0,00
Acidez total (meq.Kg <sup>-1</sup> )	60,43±0,09 <sup>b</sup>	61,80±0,08 <sup>c</sup>	64,86±0,08 <sup>a</sup>	64,97±0,01 <sup>a</sup>	68,65±0,05 <sup>d</sup>	69,25±0,09 <sup>e</sup>	0,00
5-HMF (mg.Kg <sup>-1</sup> )	0,90±0,40 <sup>a</sup>	2,99±0,54 <sup>b</sup>	4,49±0,15 <sup>c</sup>	5,640,17 <sup>d</sup>	8,89±0,08 <sup>e</sup>	9,93±0,38 <sup>f</sup>	0,00
Cor (mm Pfund)	45,23±0,00 <sup>d</sup>	51,42±0,01 <sup>a</sup>	52,66±0,00 <sup>a</sup>	60,05±0,07 <sup>b</sup>	61,58±0,00 <sup>bc</sup>	62,32±0,00 <sup>c</sup>	0,00
Diástase (°Göthe)	12,41±0,33 <sup>e</sup>	9,87±0,94 <sup>a</sup>	8,81±0,14 <sup>a</sup>	3,44±0,05 <sup>d</sup>	1,80±0,04 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,00
Sólidos insolúveis em água (%)	0,15±0,07 <sup>a</sup>	0,17±0,08 <sup>a</sup>	0,17±0,11 <sup>a</sup>	0,17±0,09 <sup>a</sup>	0,17±0,16 <sup>a</sup>	0,17±0,04 <sup>a</sup>	0,00
Cinzas (%)	0,10±0,02 <sup>a</sup>	0,13±0,03 <sup>a</sup>	0,13±0,06 <sup>a</sup>	0,13±0,05 <sup>a</sup>	0,13±0,12 <sup>a</sup>	0,13±0,05 <sup>a</sup>	0,99
Proteína (%)	0,84±0,08 <sup>a</sup>	0,78±0,05 <sup>a</sup>	0,78±0,09 <sup>a</sup>	0,74±0,07 <sup>ab</sup>	0,68±0,05 <sup>ab</sup>	0,57±0,09 <sup>b</sup>	0,99
Vitamina B3 (mg.100g <sup>-1</sup> )	1,34±0,42 <sup>b</sup>	1,84±0,53 <sup>c</sup>	1,93±0,56 <sup>c</sup>	1,36±0,43 <sup>b</sup>	ND	ND	0,01
*% RDA /20g mel B3	1,69	2,31	2,44	1,69	-	-	-

Tempo de análise: Cin (in natura); C0 (ponto zero); C90 (90 dias); C180 (180 dias); C240 (240 dias) e C365 (365 dias);

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias de acordo com teste de Tukey (p< 0,05);

RDA = Ingestão diária recomendada expressa em % (IOM, 1994);

\*% =Para o cálculo do percentual foi considerado uma porção de 20 g de mel (BRASIL, 2003);

ND = Não detectado.

O teor relativamente alto de umidade do mel de ASF é um fenômeno comum e pode apresentar problemas na estocagem do mel (CHONG et al., 2017). Os resultados de umidade, obtidos no ensaio de vida de prateleira do mel da ASF, apresentaram diferença significativa ( $p=0,00$ ) da amostra em Cin com relação à análise de C365. Pois, a umidade apresentou redução ao longo do tempo. No entanto, a amostra Cin apresentou umidade em conformidade com o limite de 40% preconizados nos estados de São Paulo (2017), e Espírito Santo (2019) os demais tratamentos exceto C180 e C270 estão de acordo com 35% de umidade, valor estabelecido pelos estados da Bahia (2014), Amazonas (2016), Paraná (2017) e no *Malaysian Standarts* (2017).

A  $A_w$  não apresentou diferença significativa ( $p=0,34$ ) com o passar do tempo. Porém, na Tabela 9 pode ser visualizado que o valor da  $A_w$  da amostra no Cin de 0,80 baixou para 0,78 no C0 e C90. No decorrer da estocagem em C180, C270 e C365 houve aumento para 0,79 sugerindo que o parâmetro se manteve estável. Esses resultados são compatíveis com os apresentados por Chong et al. (2017), em que o mel de ASF *Kelulut* submetido ao processo térmico de 90 °C por 120 minutos obteve a  $A_w$  de 0,795 em comparação com sua forma não tratada de  $A_w$  0,767, no tratamento ultrassônico realizado sob as mesmas condições de tempo e temperatura, e em temperaturas moderadas de 45 °C e 55 °C a  $A_w$  e o teor de umidade aumentaram. Os resultados encontrados no presente estudo, conforme Tabela 9, estão em conformidade com o parâmetro de  $A_w$  estipulado para mel de ASF, com limite de 0,52 a 0,80 definidos por São Paulo (2017) e Espírito Santo (2019).

O pH do mel de *M. quadrifasciata* submetido ao aquecimento a 65°C apresentou diferença significativa ( $p=0,00$ ), nos seis pontos de análise no decorrer da vida de prateleira. O pH de 3,74 na amostra Cin apresentou diminuição gradativa a partir do C0 na faixa de 3,64 até o mínimo encontrado de 2,80 no C365, e conseqüente aumento da acidez total.

Os resultados encontrados por Chuttong et al. (2016a) mostraram semelhança na reação do pH do mel de ASF *T. laeviceps*, no qual a tendência de queda foi significativa com valores de 3,7 para 3,4, durante a estocagem de 365 dias sob a temperatura de 45 °C. Ribeiro et al. (2018), estudaram os efeitos do aquecimento a 65 °C nas características físico-químicas em temperatura

controlada de 20 e 30 °C, no mel Tiúba (ASF), e observaram que esse tratamento térmico também levou a redução do pH no produto. A redução dos valores do pH dos méis tratados pode ser decorrente da aceleração térmica da concentração do íon hidrogênio via processo de decomposição de alimentos, como a hidrólise (CHAIKHAM et al., 2016).

O valor de pH sugerido (SÃO PAULO, 2017; ESPÍRITO SANTO, 2019) tem como limite entre 2,9 a 4,5, no Paraná (2017) o valor máximo é de 4,7 e para *Malaysian Standards* (2017) o valor permitido está entre 2,5 a 3,8. Assim, o pH encontrado na amostra C está em conformidade com os parâmetros preconizados. A estabilidade do mel pode ser prevista avaliando o pH e a acidez titulável, que são parâmetros importantes na extração e estocagem, pois influenciam a textura, estabilidade e prazo de validade (TERRAB; HEREDIA, 2002).

O resultado da acidez total apresentou diferença significativa ( $p=0,00$ ), quando submetido à estocagem de 365 dias. O mel in natura (Cin) com  $60,43 \text{ meq.kg}^{-1}$ , mostrou aumento ao ser submetido ao aquecimento a 65 °C, e no decorrer da vida de prateleira o teor de acidez obteve aumento até  $69,25 \text{ meq.kg}^{-1}$  no C365, que são compatíveis ao mel Tiúba (ASF), submetido ao aquecimento a 65 °C com valor de  $23,87 \text{ meq.kg}^{-1}$  para  $21,36 \text{ meq.kg}^{-1}$  (RIBEIRO et al., 2018). Altos níveis de acidez no mel podem indicar que ocorreu fermentação de açúcares por microrganismos endógenos, em condições favoráveis de umidade e  $A_w$ , resultando em aumento da acidez titulável e redução do pH (FINOLA et al., 2007).

A pesquisa realizada por Chuttong et al., (2017), corrobora com os resultados encontrados no presente estudo no qual a acidez total aumentou em relação ao tempo de estocagem e temperatura de 4 ° C, 30 ° C e 45 ° C por 6 a 12 meses no mel de ASF *T. laeviceps*.

A acidez total do mel de ASF, disposto na Tabela 9, foi inferior que o de máximo de  $80 \text{ meq.kg}^{-1}$  (AMAZONAS, 2016). Contudo, o mel de *M. quadrifasciata* da amostra C in natura (Cin), apresentou o valor de  $60,43 \text{ meq.kg}^{-1}$ , e está em conformidade com o parâmetro vigente de  $60 \text{ meq.kg}^{-1}$  no estado do Paraná (2017), exceto para os estados da Bahia (2014), São Paulo (2017) e do Espírito Santo (2019) com o limite máximo de  $50 \text{ meq.kg}^{-1}$ .

Entretanto, após a amostra C ser submetida ao aquecimento a 65 °C os valores de acidez ultrapassam ao recomendado de 50 meq.kg<sup>-1</sup> (PARANÁ, 2017) e 60 meq.kg<sup>-1</sup> (BAHIA, 2014; SÃO PAULO, 2017; ESPÍRITO SANTO, 2019). Confirmando Chuttong et al. (2017a), quando a acidez aumenta de acordo o tratamento e tempo de estocagem.

Considerando que a acidez do mel é decorrente da variação de ácidos orgânicos de diferentes floradas e conseqüentemente néctar, sugere-se reavaliar o valor máximo de acidez permitido para o mel de ASF, de acordo com a variabilidade de espécie, condição geográfica e composição físico-química.

O teor de 5-HMF por ser resultante do aquecimento em temperaturas elevadas e/ou tempo prolongado de estocagem (FREITAS et al., 2010; DE SOUSA et al., 2016), pode ser um parâmetro usado para controlar o tratamento térmico o aquecimento do mel. O conteúdo de 5-HMF altera o valor nutricional do mel e pode indicar que houve perda de enzimas, principalmente diástase (ARAÚJO et al., 2006).

O teor de 5-HMF apresentou diferença significativa ( $p=0,00$ ). O valor inicial de 0,90 mg.kg<sup>-1</sup>, da Cin do mel da ASF *M. quadrifasciata* Cin obteve aumento ao ser submetido ao aquecimento a 65 °C, mostrando valor de 2,99 mg.kg<sup>-1</sup> no C0, e no decorrer da vida de prateleira houve aumento gradativo até o valor de 9,93 mg.kg<sup>-1</sup> no C365, como mostrado na Tabela 9.

Estudo realizado por Chuttong et al. (2016a), apresentaram reações semelhantes em mel de ASF *T. laeviceps*, em que o parâmetro 5-HMF obteve aumento estatístico significativo no mel fresco após os a estocagem de 12 meses sob 30 ° C e 45 ° C, no qual apresentou a variação de 2,2 a 68,8, no mel fresco e após 12 meses subiu para valores extremamente altos de 744,52 e 7551,02 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Fato que pode ser atribuído ao tratamento térmico e período de estocagem, nesse período, sacarídeos e aminoácidos abundantes no mel pode contribuir para aceleração na reação de *Maillard*, resultando na geração de produtos não saudáveis, como o 5-HM5 (TURHAN et al., 2008), composto constituído por furosina, furano, e acrilamina, que posteriormente afetariam a qualidade do mel (LEE et al., 2016). Além disso, o aquecimento causa mudança na cor (FRAUSTO-REYES et al., 2017), e os

aminoácidos livres que são importantes componentes ativos e podem ser potenciais indicadores sensíveis ao calor no mel (ALVAREZ-SUÁREZ, et al., 2010).

O conteúdo permitido de 5-HMF varia de no máximo 10 mg.kg<sup>-1</sup> para o Estado da Bahia (2014), 20 mg.kg<sup>-1</sup> para São Paulo (2017), Espírito Santo (2019) de 30 mg.kg<sup>-1</sup> e no *Malaysian Standards* (2019) de até 40 mg.kg<sup>-1</sup>, mesmo valor estipulado pelos Estados do Amazonas (2016) e Paraná (2017). Assim, como o Codex (2001), estabelece que o teor de 5-HMF do mel de *Apis* após processamento e/ou mistura não deve ser superior a 40 mg.kg<sup>-1</sup>. No entanto, no caso de mel de origem declarada de países ou regiões com temperaturas ambientes tropicais, bem como misturas desse mel, o teor de 5-HMF não deve ser superior a 80 mg.kg<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos na Tabela 9, para o conteúdo de 5-HMF, estão em conformidade com os parâmetros anteriormente descritos. Estes resultados sugerem o conteúdo de 5-HMF aumenta à medida que o mel de ASF *M. quadrifasciata* é aquecido, conforme o aquecido a 65 °C e estocagem como o de 365 dias. Assim, o 5-HMF deve ser monitorado independente do tratamento pois esse composto aumenta à medida que o mel é aquecido ou armazenado por longos períodos em temperaturas mais altas (ÁVILA et al., 2018).

Além disso, o 5-HMF pode interferir na coloração do mel que depende também de outros fatores, como florada e teor de cinzas (ALVES et al., 2013). Assim, a cor do mel de *M. quadrifasciata* tornou-se mais escura após ser aquecido a 65 °C e apresentou diferença significativa (p=0,00), no decorrer da vida de prateleira. A cor do mel fresco (Cin) apresentou um valor na faixa de 45,23 mm na escala Pfund, denominado como âmbar extra claro. Após o aquecimento e tempo de estocagem de 365 dias. A Tabela 9 ilustra que a intensidade da cor do mel aumentou gradativamente no decorrer da estocagem.

O mel tornou-se mais escuro após o aquecimento a 65 °C com 51,42 e 62,32 nm Pfund (classificados com âmbar claro), no ponto C0 e C365, respectivamente. O mel de ASF *Kelulut* submetido a tratamento de 45 a 90 °C e tempo de tratamento de 30 a 120 minutos, registrou maior intensidade na cor do mel quando este foi submetido a 90 °C por 120 min (Chong et al., 2017). O

mel tornou-se mais escuro após o método que levou mais tempo e maior temperatura, como resultado do escurecimento não-enzimático pela reação de *Maillard* (CAN et al., 2015).

Após o ensaio de vida de prateleira da amostra de mel de ASF, que foi submetido ao tratamento térmico, foi observado que a cor, independentemente do tempo, permaneceu no limite de estipulado de incolor a pardo-escuro, conforme pode ser visto na Tabela 9. A cor do mel depende de vários fatores, como o conteúdo mineral, os méis claros costumam ter baixo teor de cinzas, enquanto méis escuros geralmente apresentam maior teor de cinzas (ALVES et al., 2013).

Assim, a partir do presente estudo ficou evidente que a cor do mel sofreu escurecimento a partir do aquecimento a 65 °C, e, que a cor se intensifica à medida que o mel é armazenado em temperatura ambiente (25 °C), sendo assim, no último tempo avaliado, 365 dias, como resultado teve-se o mel mais escuro.

Fatores como exposição à luz, calor e tempo de estocagem, com como as reações não-enzimáticas podem afetar esse parâmetro (DE SOUSA et al., 2016). Os resultados da atividade diastásica obtidos revelam diferença significativa ( $p=0,00$ ) e mostram tendência de queda da diástase do mel de *M. quadrifasciata* aquecido a 65 °C. No decorrer da estocagem, os seis pontos de análise apresentaram valores menores da atividade enzimática, com valor de 12,41 no C<sub>in</sub> para 9,87 no C<sub>0</sub>, respectivamente. Assim, a atividade da enzima no mel foi ligeiramente diminuída ao ser aquecido, e no C<sub>365</sub> não foi possível detectar a atividade diastásica. Fato esperado, pois a estocagem e o aquecimento são condições que afetam a atividade diastásica no mel (BOGDANOV et al., 2004).

Em estudo realizado por Chuttong et al. (2016a) com mel de ASF *T. laeviceps-pagdeni* a atividade diastásica do mel armazenado a 30 °C por 6 e 12 meses diminuiu progressivamente. A maior mudança na diástase foi do mel armazenado a 45 °C por 12 meses ( $0,4 \pm 0,5$  unidades Schade). Aos 30 e 45 °C de estocagem, a diástase aos 6 e 12 meses diminuiu em 45 e 78% e 80 e 82%, respectivamente.

Os valores de atividade diastásica encontrados estão em conformidade com o máximo de 40 °Göthe permitido no Estado do Paraná (2017) e fora dos parâmetros de 0,3 °Göthe estipulados nos estados da Bahia (2014) e no Amazonas (2016).

A enzima diastásica, incluindo  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases, aparecem naturalmente nos méis florais e seu conteúdo depende das fontes florais e da origem ecológica do mel (DA SILVA et al., 2016). Além disso, a diástase origina-se das secreções de saliva das abelhas, e relevante para o perfil enzimática específica da espécie de abelha (FUENMAYOR et al., 2013). As enzimas são adicionadas pela abelha durante a coleta e o amadurecimento do néctar em mel. Alguns néctares são mais espessos que os outros, então os menores polens precisam de menos modificações pelas abelhas (WHITE, 1994). Os níveis de diástase no mel de ASF variam com um intervalo de 2,4-21,3 e 9-23,0 °Göthe nos estudos de Vit et al. (2013) e Souza et al. (2006), respectivamente.

Os sólidos insolúveis em água apresentado na Tabela 9, apresentaram diferença significativa ( $p=0,00$ ) nos pontos avaliados. A amostra Cin passou de 0,15% para 0,17% após ser submetido ao aquecimento a 65 °C (C0), e se manteve estável no C90, C180, C270 e C365, além disso, não atenderam o limite máximo de 0,1% de sólidos insolúveis (BAHIA, 2014; SÃO PAULO, 2017; PARANÁ, 2017; MALAYSIAN STANDARTS, 2017; ESPÍRITO SANTO, 2019) para o mel de ASF.

O resultado do teor de cinzas não apresentou diferença significativa ( $p=0,99$ ), mas o valor variou de 0,10% no Cin, e se manteve estável com 0,13% de cinzas, no mel aquecido nos demais pontos de análises. Chuttong et al. (2016a) estudaram o efeito do teor de cinzas do mel de ASF *T. laeviceps* fresco armazenado sob a temperatura de 4, 30 e 45 °C por 6 e 12 meses, e os níveis de cinza aumentaram sob todas as condições testadas, mas, foram tão leves que não apresentaram diferença significativa para o tempo e temperatura estudados.

O teor de cinzas tem valor diferenciado do limite padrão em alguns estados do Brasil, como na Bahia (2014), Amazonas (2016) São Paulo (2017) e no Espírito Santo (2019), máximo de 0,6%, e no estado do Paraná (2017) é de 0,8%, para *Malaysian Standarts* (2017) o limite máximo permitido é de 1%. O

teor de cinzas da amostra C, tanto no Cin quanto no mel aquecido a 65 °C apresentou conformidade com os parâmetros estipulados para mel de ASF, conforme Tabela 9.

O resultado do teor de proteína não apresentou diferença significativa ( $p=0,99$ ) com o valor de 0,57%, no C365 quando comparado com o Cin e C0, de 0,84 e 0,78%, respectivamente, após o tempo de estocagem, como descrito na Tabela 9. O teor proteína não é estendido como parâmetro determinado para o mel de ASF.

Em relação à vitamina do complexo B e o respectivo vitâmeros B3 identificado e quantificado na amostra C, foi possível perceber que o mel de *M. quadrifasciata* ao ser submetido ao aquecimento, concentrou a vitamina B3 apresentando diferença significativa ( $p=0,01$ ), quando comparado com T0 (1,34 mg.100g<sup>-1</sup>) e 1,84 mg.100g<sup>-1</sup> no C0. Com o tempo de estocagem a vitamina demonstrou-se como limitante para a vida de prateleira deste produto já que ocorreram perdas significativas no C180, não sendo possível detectar o micronutriente após 270 dias do tratamento térmico no mel.

#### 4.2.2 Contagem microbiológica

A eficiência do aquecimento a 65 °C na redução da carga microbiológica do mel de ASF da espécie *M. quadrifasciata* foi avaliada mediante contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias aeróbio mesófilo, bolores e leveduras, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, como mostra a Tabela 10.

TABELA 10 – VALORES DA LETALIDADE DE AERÓBIO MESÓFILO, BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA, BOLORES E LEVEDURAS, COLIFORMES TOTAIS, E. COLI, E SALMONELLA SPP. NO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA APÓS O AQUECIMENTO A 65 °C

Amostra	Microrganismo					
	Aeróbio mesófilo (Log <sup>10</sup> UFC.g-1)	Bactéria ácido láctica (Log <sup>10</sup> UFC.g-1)	Bolores e Leveduras (Log <sup>10</sup> UFC.g-1)	Coliformes totais (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp. (25g)
Cin	2,96±0,30 <sup>d</sup>	2,94±0,08 <sup>b</sup>	3,02±0,20 <sup>c</sup>	ND	ND	Ausente
C0	1,57±0,30 <sup>c</sup>	0,26±0,45 <sup>a</sup>	1,27±0,01 <sup>a</sup>	ND	ND	Ausente
C90	0,92±0,02 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,06±0,76 <sup>a</sup>	ND	ND	Ausente
C180	0,39±0,35 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,58±0,51 <sup>ab</sup>	ND	ND	Ausente
C270	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,36±0,10 <sup>ab</sup>	ND	ND	Ausente
C365	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	ND	ND	Ausente
p	0,00	0,00	0,00	-	-	-

Tempo de análise: Cin (in natura); C0 (ponto zero); C90 (90 dias); C180 (180 dias); C240 (240 dias) e C365 (365 dias);

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre médias de acordo com teste de Tukey (p<0,05).

Na contagem da BAL do mel ASF in natura (Cin), foi possível verificar valor de 2,94 Log<sup>10</sup> (Cin), sugerindo concentração significativa de microrganismos benéficos. Porém, ao ser submetido ao tratamento térmico a contagem apresentou redução significativa com valor de 0,26 Log<sup>10</sup>, no ponto zero do aquecimento (C0). A partir do C90 com valor de 0,00 Log<sup>10</sup>, não foi detectado a BAL até completar 365 dias de estocagem. Foi possível perceber que o aquecimento eliminou o microrganismo benéfico do produto.

Na contagem de aeróbio mesófilo, foi relatada a redução desse microrganismo ao passar do tempo, sendo que, a contagem no Cin foi de 2,96 Log<sup>10</sup> UFC/g valor em conformidade com o padrão preconizado pela legislação Código Alimentar Argentino (CAA, 1998), no qual tem o nível máximo permitido de 106 UFC g<sup>-1</sup>, C0 obteve a média de ±1,39 Log<sup>10</sup> na redução do microrganismo. A partir do C270 não foi possível detectar o microrganismo.

Para bolores e leveduras as contagens apresentaram redução significativa (p=0,00) na amostra C após ser submetida ao aquecimento a 65 °C. O Cin registrou valor inicial de 3,02 Log<sup>10</sup>UFC/g, assim, encontra-se em conformidade com legislação vigente (BRASIL, 2000). Após o impacto da pasteurização a carga microbiana foi ligeiramente diminuída, e obteve uma média de ±1,94 Log<sup>10</sup> UFC/g na redução do microrganismo, sendo assim, a

redução foi subsequente até completar 365 dias de estocagem, com valor de  $0,00 \text{ Log}^{10} \text{ UFC/g}$  no C365.

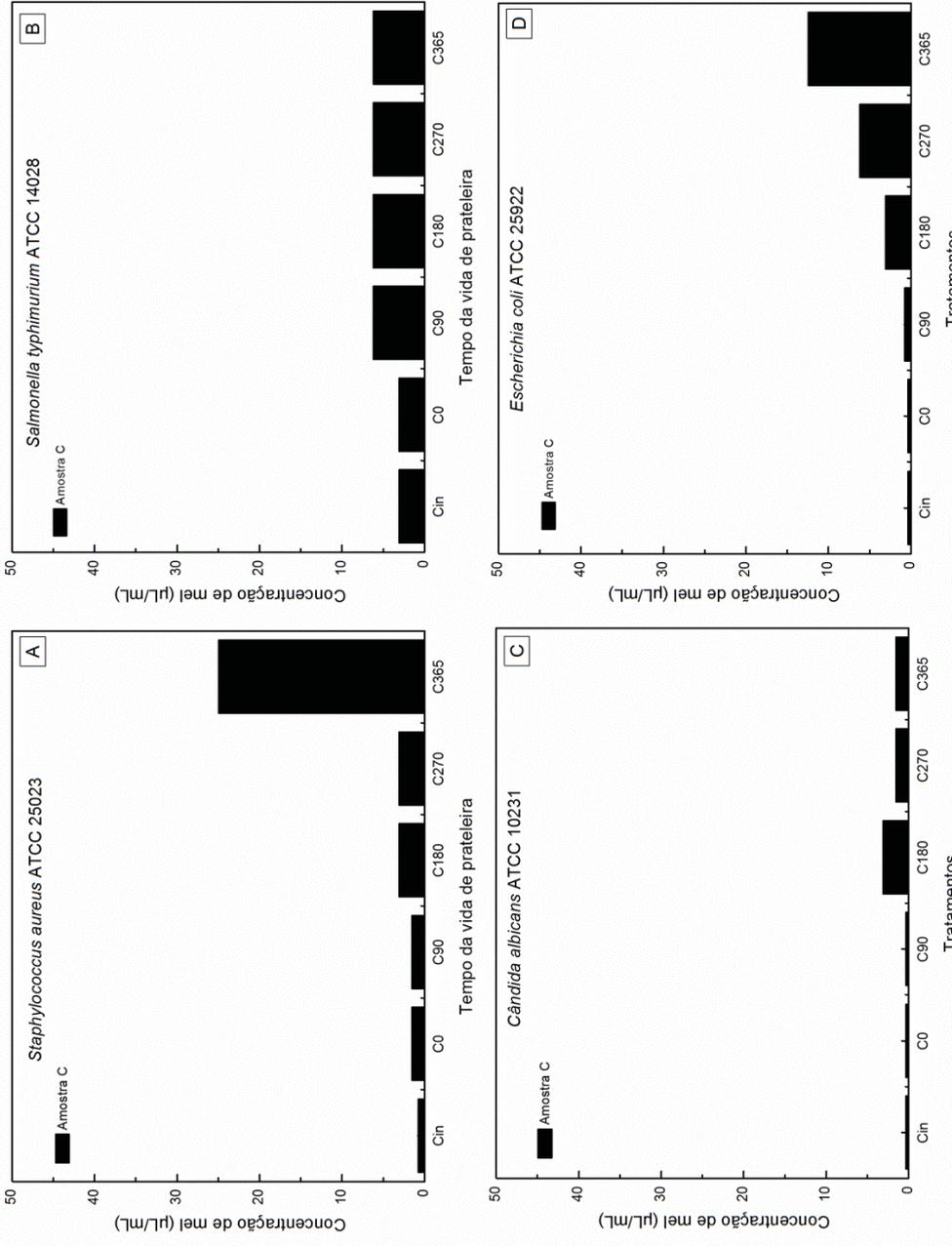
Foi observada a ausência de coliformes totais, *E. coli* e *Salmonella*, em conformidade quanto ao padrão de identidade e qualidade do mel (BRASIL, 2000), estando de acordo com os padrões exigidos para mel de ASF, conforme descrito na Tabela 10.

A amostra C apresentou baixa contagem microbiana indicando boa qualidade higiênico-sanitária, assim como, a eficiência da pasteurização a  $65^\circ\text{C}$  na redução dos microrganismos. Em contrapartida, a contagem da BAL foi reduzida completamente na composição do mel aquecido após 90 dias de estocagem, indicando-se assim que o mel de ASF da espécie *M. quadrifasciata* perde a propriedade terapêutica proporcionada pela BAL ao ser submetido a essas condições.

#### 4.2.3 Atividade antimicrobiana do mel de *Melipona* Mandaçaia aquecido a $65^\circ\text{C}$

Para avaliar a atividade antimicrobiana, foram considerados valores de CIM em concentração de ( $\mu\text{L/mL}$ ) de mel de *M. Mandaçaia*, utilizado para inibir os microrganismos *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *C. albicans* e *E. coli*, respectivamente, como mostrado na Figura 7.

FIGURA 7 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE MELIPONA MANDAÇAIA AQUECIDO A 65 °C



FONTE: A autora (2019)

Tempo de análise: Cin (in natura); C0 (ponto zero); C90 (90 dias); C180 (180 dias); C240 (240 dias) e C365 (365 dias);

Para o microrganismo *S. aureus*, Figura 8, foi observado que houve uma redução no potencial antimicrobiano do mel com o passar do tempo, sendo que, no C365 foi necessária uma concentração de mel (25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), maior quando comparada aos demais tempos, no Cin a concentração utilizada foi de 0,78  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

Para a *Salmonella typhimurium*, Figura 7B, foi observado que houve pouca variação na concentração inibitória mínima. O Cin e o C0 tiveram-se as mesmas concentrações de 3,13  $\mu\text{L}/\text{mL}$  e, a partir do C90 até o C365 os valores permaneceram constantes (6,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).

Na análise de CIM para *C. albicans* o Cin, C0 e C90 exerceram maior potencial antimicrobiano, no qual foram encontrados os menores valores de CIM 0,39  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de mel, se mostrando eficaz para inibição do microrganismo. Posteriormente, foi possível perceber que no C180 houve variação no CIM, com maior concentração de mel de 3,13  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Embora no C270 aumentou potencial antimicrobiano, sendo necessária menor quantidade de mel com 1,56  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , após isso o valor de CIM apresentou estabilidade até completar C365 de armazenamento.

Para a *Escherichia coli*, Figura 7, foi observado que com o passar do tempo o mel perdeu a capacidade inibitória desse microrganismo, sendo assim, no C365 foi necessária maior concentração de mel para inibição quando comparados os tempos anteriores.

De modo geral, a amostra C demonstrou possível segurança na utilização do mel de *M. Mandaçaia* como agente antimicrobiano, no qual foi necessário utilizar a CIM de 25,00  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de mel para inibir *S. aureus*, 6,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para *Salmonella*, 1,56  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para *C. albicans* e 1,56  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para *E. coli*. Para garantir segurança na utilização do mel de *Mandaçaia* após a pasteurização a 65 °C e armazenamento são necessários a quantidade de 25  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de mel, e pode ser considerada uma alternativa viável de baixo custo e ecologicamente sustentável para ser utilizado como agente antimicrobiano.

## 5 CONCLUSÃO

A análise das amostras mostra que o tratamento ultrassônico (T2), aquecido a 55 °C (T3), aquecido a 65 °C (T4) e refrigerado ( $4 \pm 2$  °C) (T6) apresentam alterações significativas nas características físico-químicas, quando comparados aos méis in natura (T0). Além disso, a amostra submetida ao T4 aumenta o valor da vitamina B3, e o T6 diminuem os teores dos vitâmeros B3 (amostra A e B) e B9 na amostra B. Após a realização das análises microbiológicas, é possível perceber que os T2, T3 e T4 reduziram os microrganismos indicadores de qualidade como, aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, além de proporcionar a manutenção da microbiota benéfica (bactéria ácido láctica) e atividade antimicrobiana. Com isso, os T2, T3 e T4 são os tratamentos térmicos recomendados para mel de ASF.

O estudo experimental da vida de prateleira do mel de ASF aquecido a 65 °C mostra que a partir de 90 dias de estocagem ocorrem alterações nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Dessa forma, os resultados, sugerem que o mel aquecido seja consumido em até 90 dias.

Assim, acredita-se que esse estudo, além de contribuir para banco de informações do padrão de identidade e qualidade, pode auxiliar os meliponicultores na escolha do tratamento, como também, subsidiar informações para políticas públicas quanto ao processamento adequado para o mel de ASF.

## REFERÊNCIAS

- ABU BAKAR, M. F.; SHUAIBU, B. S.; ABU BAKAR, F. I.; CONG, O. J.; ZAKBAH, M. Physicochemical and Antioxidant Potential of raw unprocessed honey from Malaysian stingless bees. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.16, n. 11, p. 888–894, 2017.
- ADADI, P.; OBENG A. K. Assessment of bacterial quality of honey produced in Tamale metropolis (Ghana). **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 369 – 373, 2017.
- AHMED, M.; AISSAT, S.; KHIATI, B.; MESLEM, A.; BACHA, S. In Vitro activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, India, v.3, n. 10, p. 816-821, 2013.
- AIDAR, D. S. A Mandaçaia: biologia de abelhas, manejo e multiplicação artificial de colônias de *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Série Monografias**, Ribeirão Preto, n. 4, p. 103, 1996.
- AL, M. L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, v. 112, p. 863–867, 2009.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; STRAMM, K. M.; HORITA, A.; BARTH, O. M.; SILVA DE FREITAS, A.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science Technology**, v. 48, n. 8, p. 1698 – 1706, 2013.
- ALVES, A.; RAMOS, A.; GONÇALVES, M. M.; BERNARDO, M.; MENDES, B. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 2, p. 130 – 138, 2013.
- ALVES, T. T. L.; MENESES, A. R. V.; SILVA, J. N.; PARENTE, G. D. L.; HOLANDA NETO, J. P. Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista Verde**, Mossoró, v. 6, n. 3, p. 91 – 97, 2011.
- AMAZONAS. **Portaria ADAF nº 253, 31 outubro 2016**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de Abelha sem ferrão para o Estado do Amazonas. Agência de Defesa a Agropecuária e Florestal do Estado do Amazonas – ADAF/AM, 2016.
- ANKLAM, E.A. Review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. **Arlington: A.O.A.C.**, 2005.

ARAÚJO, D. R.; SILVA, R. H. D; SOUSA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade de Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n.1, p. 51 – 56, 2006.

ÁVILA S., BEUX; M. R.; RIBANI, R. H.; ZAMBIAZI, R. C. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health- promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, p. 37 – 50, 2018.

BAHIA. **Portaria ADAB nº 207, 26 de novembro**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do mel de Abelha Social sem Ferrão do gênero *Melipona*. Legislação Estadual – Estado da Bahia. Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia – ADAB, 2014.

BALLIVIÁN, J. M. P. P. Abelhas Nativas sem Ferrão. **São Leopoldo: Oikos**, 2008.

BARBOSA, D. B.; CRUPINSKI, E. F.; SILVEIRA, R. N.; LIMBERGER, D. C. H. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Unidade Universitária em Tapes, RS, Brasil. v. 3, n. 4, p. 694 – 703, 2017.

BARTELLI, B. F.; SANTOS, A. O. R.; NOGUEIRA-FERREIRA, F. H. Colony performance of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Meliponina) in a Greenhouse of *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). **Sociobiology**, p. 60–67, 2014.

BERTONCELJ, J.; GOLOB, T.; KROPF, U.; KOROSEC, M. Characterization of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1661–1671, 2011.

BIJLSMA, L.; BRUIJN, L. L. M.; MARTENS, E. P.; SOMMEIJER, M. J. Water content of stingless bee honey (*Apidae, Meliponini*): Interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, p. 480 – 486, 2006.

BILUCA, F.C.; BETTA, F.D.; DE OLIVEIRA, G.P.; PEREIRA, M.P.; GONZAGA, L.V.; COSTA, A.C.O.; ROSEANE, F. Content of 5-HMF and carbohydrates in honey from stingless bees by EC before and after heat treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 244 – 249. 2014.

BILUCA, F. C. F.; BRAGHINI.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; ROSEANE, F. Physicochemical profiles, minerals, and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*). **Journal Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61–69, 2016.

BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L. P. Physical-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. **Apidologie**, v. 35 n. 1, p. 4 – 17, 2004.

BRASIL. **Resolução RDC nº 359**. Ministério da Saúde. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalado. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2003.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.16–17, 2000.

BRASIL. **Resolução RDC nº 12**. Ministério da Saúde. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2001.

BRASIL. **Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro**. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de Proteína, vitaminas e minerais. Agência nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2005.

BUENO-COSTA, F. M.; ZAMBAZI, R. C.; BOHMER, B.; CHAVES, F. C.; SILVA, W. P.; ZANUSSO, J. T.; DUTRA, I. Antibacterial and antioxidante activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 333–340, 2016.

CAA. Código Alimentar Argentino. **De la Canal e Asociados: Buenos Aires, Argentina, 1998**. Disponível em: <[www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/marco/capitulospdf/Capitulo\\_X](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/marco/capitulospdf/Capitulo_X)>. Acesso em: 26 Jun. 2019.

CAC - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **CAC/VOL III**, Suppl. 2. ed. 1. Rome: FAO/WHO, p.14–15, 1990.

CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Stingless bee honey: technical regulation proposal. **Brazil Journal Food Technology**, Campinas, v. 20, 2017.

CAN, Z.; YILDIZ, O.; SAHIN, H.; AKYUZZTURUMTAY E.; SILICI, S.; KOLAYLI, S. An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, v. 180, p. 133–141, 2015.

CARVALHO-ZILSE, G. A.; VILAS BOAS, H. C.; COSTA, K. B.; NUNES-SILVA, C. G.; SOUZA, M. T.; FERNANDES, R. S. **Meliponicultura na Amazônia**, Manaus. p. 50, 2012.

CHAIKHAM, P.; KEMSAWASD, V.; APICHARTSRANGKOON, A. Effects of convention and ultrasound treatments on physic chemical properties and antioxidant capacity of floral honeys from *Northern Thailand*. **Food Bioscience**, v.15, p. 19–26, 2016.

CHERNETSOVA, E. S.; MORLOCK, G. E. Assessing the capabilities of direct analysis in real time mass spectrometry for 5-hydroxymethylfurfural quantitation in honey. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 314, p. 22–32, 2012.

CHONG, KY.; CHIN, NL.; YUSOF, Y. A. Thermosonication and optimization of stingless bee honey processing. **Food Science and Technology International**, Selangor, Malaysia p.1–15. 2017.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. Effects of long term storage on stingless bee (*Hymenoptera: Apidae: Meliponini*) honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 441- 451, 2016a.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. Physicochemical profiles of stingless bee (*apidae: Meliponini*) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149-155, 2016b.

CIULU, M.; SOLINAS, S.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M.I.; PIU, P.C.; SPANO, N.; SANNA, G. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. **Talanta**, v.83, n. 3, p. 924–929, 2011.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard - Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.

CODEX STAN 12. **Codex Alimentarius Comission. Codex Standard for Honey**, v. 11, n. 2, p. 1–8, 2001.

CORTOPASSI, L. M. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275–292, 2006.

CRIAR ABELHAS. Abelhas Mandaçaia. Disponível em: <<https://www.criarabelhas.com.br/abelhas-mandacaia/>>. Acesso em 17 fevereiro 2019.

DA SILVA, P.M.; GAUCHE C.; GONZAGA L. V.; COSTA A.C.; FETT R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, 309–323, 2016.

DASH, N.; PANIGRAHI, D.; AL-ZAROUNI, M. Antimicrobial Effect of Honey from the Arabian Gulf Region against Bacterial Isolates from Pus and Wound Swabs. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 745–752, 2016.

DE SOUSA, J. M. B.; SOUZA, E. L. DE G.; MARQUES, M. D. T.; BENASSI, B.; GULLÓN, M. M.; MAGNANI, M. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie-Food Science and Technology**, v. 65, p. 645–651, 2016.

DEL SARTO, M. C. L. Avaliação de *Melipona quadrifasciata Lepelitier* (*Hymenoptera: Apidae*) como polinizador da cultura do tomateiro em cultivo

protegido. **Tese (Doutorado)** Universidade Federal de Viçosa, Programa de pós-graduação em Entomologia, Viçosa, MG, Brasil, 2005.

DIAS, M. P. S.; CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTELI, M. N.; BERTO, M. I. Levantamento de tecnologias de conservação de mel de abelhas nativas em função de suas propriedades físico-químicas. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - CIIC 2014, 8., 2014, **Campinas. Anais**, Campinas: ITAL, 2014.

DOWNES, F. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. **Washington: American Public Health Association (APHA)**, p.676, 2001.

DRUMMOND, M. S. Maturation of stingless bee pot-honey: a new frontier in the gastronomical market. **Stingless bee process honey and pollen in cerumen pots**, 2013.

DÜMEN, E.; AKKAYA, H.; ÖZ, G. M.; SEZGIN, F.H. Microbiological and parasitological quality of honey produced in Istanbul. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences Science**, 2013.

ELIAS-SANTOS, D.; M.D.C.Q. FIALHO, R; VITORINO, L.L.; OLIVEIRA, J.C.; ZANUNCIO, J.E. Serrão Proteome of the head and thorax salivary glands in the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Apidology**, v. 44, n. 6, p. 684–698, 2013.

ESCUREDO, O.; DOBRE, I.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; SEIJO, M.C. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v. 149, p. 84–90, 2014.

ESPÍRITO SANTO. Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo – IDAF – nº 001 de 17 de abril de 2019. Regulamento Técnico que fixa a identidade e qualidade do mel produzido por abelhas melipônidas (*Meliponinae*, *Hymenoptera*, *Apidae*). **Diário Oficial dos Poderes do Estado**, Espírito Santo, ES, 2019.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S. D.; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em regiões distintas no Estado do Paraíba. **Ciência rural**, v. 35, n. 5, p.1166–1171, 2005.

FEÁS, X.; PIRES, J.; ESTEVINHO, M. L.; IGLESIAS, A.; ARAUJO, J. P. P. Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1255–1262, 2010.

FELSNER, M. L.; CANO C.B.; BRUNS, R.E.; WATANABE, H.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MATOS, J.R. Caracterização de méis monoflorais pelo teor de cinzas através de um desenho hierárquico. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 17, 737–747, 2004.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de Alimentos de Fennema. Editora: **Artmed**, 4. ed., 900 p, 2010.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, Argentina, v. 100, p. 1649–1653, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos, 2. Ed. São Paulo: **Atheneu**, 2008.

FRAUSTO-REYES, C.; CASILLAS-PEÑUELAS, R.; QUINTANAR-STEPHANO, J. L.; MACÍAS-LÓPEZ, E.; BUJDUD-PÉREZ, J. M.; MEDINA-RAMÍREZ, I. Spectroscopic study of honey from *Apis mellifera* from different regions in Mexico. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 178, n. 5, p. 212 – 217, 2017.

FRAZÃO, R. F. Abelhas nativas da Amazônia e populações tradicionais: manual de meliponicultura. 1. ed. Belém, PA: **Instituto Peabiru**, p. 50, 2013.

FREITAS, W. E. S.; AROUCHA, K. M. DE P.; SOARES, F. I. DE B.; MENDES, V. R.; DE OLIVEIRA, C. R. Parâmetros físico-químicos do mel de abelha sem ferrão (*Melipona subnitida*). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 153– 57, 2010.

FUENMAYOR, C. A.; DÍAZ-MORENO, A. C.; ZULUAGA-DOMÍNGUEZ, C. M.; QUICAZAN, M. C. Honey of Colombian Stingless Bees: Nutritional Characteristics and Physicochemical Quality Indicators. **Springer Science**, Pot-honey. Nova York, p. 383 – 394, 2013.

GIANNINI, T. C.; ACOSTA, A. L.; GARÓFALO, C. A.; SARAIVA, A. M.; ALVES-DOS-SANTOS, I.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. **Ecological Modelling**, São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 127-131, 2012.

GLEITER, R. A. H.; HORN, H. D. Isengard. Influence of type and state of crystallisation on the water activity of honey. **Food Chemistry**, v. 96, pp. 441–445, 2006.

GOIS, G. C.; RODRIGUES, A. E; SILVA, E. O.; CAMPOS, F. S. Qualidade microbiológica do mel de abelhas *Melipona Scutellaris*. **Pubvet**, v. 4, n. 9, p. 114, 2010.

GONÇALVES, R. B.; MELO, G. A. R.; AGUIAR, A. J. C. A assembléia de abelhas (*Hymenoptera, Apidae*) de uma área restrita de campos naturais do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná e comparações com áreas de campos e cerrado. **Papéis Avulsos de Zoologia**, p.163–181, 2009.

GUERRINI, A.; BRUNI R.; MAIETTI S.; POLI F.; ROSSI, D.; PAGANETTO G.; MUZZOLI, M.; SCALVENZI, L.; SACCHETTI, G. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1413–1420, 2009.

GRABOWSKI, N, T. H.; KLEIN, G. Microbiology of processed edible insect products – Results of a preliminary survey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 243, p. 103-107, 2017.

HABIB, H.M.; MEQBALI, F.T. AL.; KAMAL, H.; SOUKA, U. H.; IBRAJIM, W. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, p. 28–34, 2014.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para análise de alimentos. **São Paulo**, IV Edição – 1 Edição Digital, 2008.

IOM, Institute of Medicine; Food and Nutrition Board. How Should the Recommended Dietary Allowances. **National Academy Press**, Washington, DC, 1994.

IHC, INTERNATIONAL HONEY COMMISSION. Harmonised Methods of the International Honey Commission. **Swiss Bee Research Centre**, Bern: FAM, Liebefeld, p. 63, 2009.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; CANHOS DAL, ALVES DA (Org.). Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo, **EDUSP**, 2012.

JANGHU, S.; BERA, M. B.; NANDA, V.; RAWSON, A. Study on Power Ultrasound Optimization and Its Comparison with Conventional Thermal Processing for Treatment of Raw Honey. **Food Technol Biotechnol**, Zagreb, v. 55, n. 4, p. 570 – 579, 2017.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. A abelha uruçu: biologia, manejo e conservação. **Belo Horizonte: Acangaú**, 143 p., 1996.

KLEJDUS, B.; PETRLOVÁ, J.; POTEŠIL, D.; ADAM, V.; MIKELOVÁ, R.; VACEK, J.; KIZEK, R.; KUBÁN, V. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 57–6, 2004.

KOWALSKI, S. Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. **Food Chemistry**, v. 141, ed. 2, p.1378–138, 2013.

LEE, H-M.; YANG, S-Y.; LEE, K-W. Analysis of *Maillard* reaction products, carboxymethyllysine, furosine, hydroxymethylfurfural, furan and acrylamide during processing infant formula. **The FASEB Journal**, v. 30, pp. 673 – 678, 2016.

LEŠKOVÁ, E.; KUBÍKOVÁ, J.; KOVÁČIKOVÁ, E.; KOŠICKÁ, M.; PORUBSKÁ, J.; HOLČÍKOVÁ, K. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 4, p. 252 - 276, 2006.

MALAYSIAN STANDARDS. Kelulut (Stingless Bee) Honey – Specification **Department of Standards Malaysia**. MS, p. 2683, 2017.

MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S.; MORETI, A. C. C. C.; PINTO, A. S. **Mel Brasileiro**: composição e normas; Ribeirão Preto, p. 111, 2004.

MARCHINI, L. C.; SOUZA, B. A. **Composição físico-química, qualidade e diversidade dos méis brasileiros de abelhas africanizadas**. In: Congresso Brasileiro de Apicultura. Anais. Congresso Brasileiro de Meliponicultura, 2., Aracaju, 2006.

MAVRIC, E.; WITTMANN, S.; BARTH, G.; HENLE, T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. Mol Nutr. Foods Res. from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, v.65, p 333–340, 2008.

MENDES, C. As Análises de Mel: Revisão. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 07–14. 2009.

MONIRUZZAMAN, M.; CHOWDHURY, M. A. Z.; RAHMAN, M. A.; SULAIMAN S. A.; GAN, S. H. Determination of Mineral, Trace Element, and Pesticide Levels in Honey Samples Originating from Different Regions of Malaysia Compared to Manuka Honey. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2014.

MOREIRA, R. F. A. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**, v. 121, p. 697–704, 2010.

MUHIALDIN, B. J.; HASSAN, Z. SADON, S. K. NURAQILAH, Z. AND AZFAR, A. A. Effect of pH and Heat Treatment on Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Lactobacillus pentosus* G004 and *Pediococcus pentose ceus* Te010. Innovative Romanian. **Food Biotechnology**, v. 8, p. 41–53, 2011.

NISHIO, E. K.; KRUPINISKI, M. T.; KOBAYASHI, R. K. T.; PRONI, E. A.; AKAZATO, G. **Avaliação da Atividade Antibacteriana de Dois Méis de Abelhas Indígenas Sem Ferrão Contra Bactéria de Importância Alimentar**. Anais do 12º Congresso Latino americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos – MICROAL, São Paulo, v.1, n.1, 2014.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: **Nogueirapis**, p. 446, 1997.

NORDIN, A.; SAINIK, N. Q. A. V.; SHIPLU R. C.; AMINUDDIN B. S.; RUSZYMAH B. H. Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 73, p. 91-102, 2018.

ODDO, L. P.; HEARD, T. A.; RODRIGUEZ-MALAVAR, A.; PEREZ, R. A.; FERNANDEZ-MUINO, M.; SANCHO, M. T.; SESTA, G.; LUSCO, L.; VIT, P.

Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 789-794, 2008.

OLIVEIRA, D.; SILVA, D.; SOUZA, A.; JUNIOR, C.; SODRÉ, G.; CARVALHO, C. Avaliação de métodos de conservação do mel de *Melipona quadrifasciata* com base no perfil sensorial e aceitabilidade. **Magistra, Cruz das Almas**. Bahia, v. 25, n. 1, p. 1–6, 2013.

OLIVEIRA, P. S.; MULLER, R. C. S.; DANTAS, K. G. F.; ALVES, C. N.; VASCONCELOS, M. A. M.; VENTURIERE, G. C. Ácidos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (*Apidae*, *Meliponini*) e *Apis Mellifera* (*Apidae*, *Apinini*) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

ORTIZ, V. E.; DZIB, L. R.; LOPE, A. J.; RAMON-SIERRA, J.; MAGANA-ORTIZ, D. Honey Microflora Associated with the *Stingless Bee Melipona Beecheii*. Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica, **Instituto Tecnológico de Mérida**, Mérida, Yucatán, Mexico, 2016.

ØSTLIE, H. M.; HELLAND, M. H.; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 1–2, p. 17–27, 2003.

PARANÁ. **Portaria nº 63, 10 março 2017**. Agência da Defesa Agropecuária do Paraná. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de Abelha sem ferrão para o estado do Paraná. ADAPAR, 2017.

PASIAS I.N. I.K.; KIRIAKOU, C. Proestos HMF and diastase activity in honeys: a fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. **Food Chemistry**, v. 229, p. 425–431, 2017.

PIMENTEL, R. B.; DA COSTA C. A.; ALBUQUERQUE, P. M.; JUNIOR, S. D. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 151, 2013.

PUSCAS, A.; HOSU, A.; CIMPOIU, C. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. **Journal of Chromatography**, v. 1272, p. 132–135, 2013.

QUINOÑES-VARQUEZ, C. R. V.; TERRAZAS, R. M.; BONIFACIO, I. N.; RAMIREZ, Q.I. E.; SALINAS, C.V. Microbiological assessment of honey in Mexico. Calidad microbiológica de la mielem México. **Revista Argentina de Microbiología**. Coordinación de Nutrición, Centro Universitario Incarnate Word-México, 2017.

RAMÓN-SIERRA, J. M.; RUIZ-RUIZ, J. C.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E. D. L. L. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 183, p. 43–48, 2015.

RAO, P. V. K. T.; KRISHNAN, N.; SALLEH, S. H. G. Biological and therapeutic effects of honey produced by honeybees and stingless bees: A comparative review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 5, p. 657–664, 2016.

REYES-GONZÁLEZ, A.; CAMOU-GUERRERO, A.; GÓMEZ-ARREOLA, S. From Extraction to Meliponiculture: A Case Study of the Management of Stingless Bees in the West-Central Region of Mexico. **Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research**, p. 201–223, 2016.

RIBEIRO G. P.; VILLAS-BÔAS, J. K.; SPINOSA, W.A.; PRUDENCIO, S.H. Influence of freezing, pasteurization and maturation on Tiúba honey quality **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 607–612, 2018.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. 2 ed. São Paulo: **Editora Edgard Blucher**, p. 184, 2007.

ROCHA, M. C. L. S. A. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: **IBAMA**, 2012.

ROUBIK, D.W. Stingless bee nesting biology. **Apidologiev.** 37, p.124–143, 2006.

SAEEDUDDIN, M.; ABID, S.; JABBAR, T.; WU, M.M.; HASHIM, F.N. Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. **LWT-Food Science and Technology**, p. 452–458, 2015.

SANCHO, M. T.; MATO, IJF.; HUIDOBRO, M. A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO; PASCUAL-MATÉ, A. **Nonaromatic organic acids of honeys. Pot – Honey**. p. 447–458, 2013.

SÃO PAULO. **Resolução normativa SAA, nº 52 de 3 de outubro de 2017**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade, o padrão de qualidade do mel elaborado pelas abelhas sem ferrão da subfamília Meliponinae (*Hymenoptera, Apidae*). Diário Oficial da União, São Paulo, 2017.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de *Maillard* em alimentos: implicações para a saúde. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 24, n. 6, p. 895–904, 2011.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 2–3, p. 260–265, 2004.

SILVA, K. F. N. L.; SANTOS, D. C.; SILVA, C. T. S.; QUEIROZ, A. J. M.; LIMA, A. O. N. Comportamento reológico do mel de *Apis mellifera* do Município de Tabuleiro do Norte – CE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 1, p. 52–57, 2010.

SILVA, M. C. P. **Caracterização físico-química, teor de antioxidante e perfil sensorial de méis de abelhas submetidos à desumidificação e umidificação**. Tese de mestrado. 2015.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Meliponassubnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, Pernambuco, v. 29, p.10–18, 2013.

SILVA NEVES, K. C.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of yeasts from Amazon Region for extracellular protease production. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 299 – 306, 2006.

SILVANO, M. F.; VARELA, M. S.; PALÁCIO, M. A.; RUFFINENGO, S. D. K. Y. Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. **Food Chemistry**, v. 152, p. 500–507, 2014.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte, p. 256, 2002.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidology**, v. 41, n. 3, pp. 295 – 311, 2010.

SNOWDON, J. A.; CLIVER, D.O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1–3, p. 1–26, 1996.

SODRÉ, G.; CARVALHO, C.; FONSECA, A.; ALVES, R.; SOUZA, B.; Sensorial profile and acceptability of stingless bee honey submitted to conservation processes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 72–77, 2008.

SOLAYMAN, M.; ISLÃ M. A.; S. Paulo, ALI Y.; KHALIL M. I.; ALAM N.; GAN S. H. Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety**, v. 15, p. 219 – 233, 2016.

SOUZA, J. M. B.; AQUINO, I. S.; MAGNANI, M.; ALBUQUERQUE, J. R.; SANTOS, G. G.; SOUZA, E. L. Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Seminário: **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1765–1774, 2013.

SOUZA, B.; ROUBIK, D.; BARTH, O.; HEARD, T.; ENRÍQUEZ, E.; CARVALHO, C.; VILLAS-BÔAS, J.; MARCHINI, L.; LOCATELLI, J.; PERSANO-ODDO, L.; ALMEIDA-MURADIAN, L.; BOGDANOV, S.; VIT, P. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Asociación Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 867 – 875, 2006.

SUBRAMANIAN, R.; UMESH HEBBAR, H.; RASTOGI, N, K. Processing of Honey: A Review. **International Journal of Food Properties**, p. 127–143, 2007.

- SUHARTATIK, N.; CAHYANTO, M. N.; RAHARDJO S.; MIYASHITA, M. Isolation and identification of lactic acid bacteria producing  $\beta$  glucosidase from Indonesian fermented foods. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 3, p. 973-978, 2014.
- TAO, Y.; SUN, D. Enhancement of food processes by ultrasound: a review. **Food Science and Nutrition**, v.55, n.4, p.570–594, 2015.
- TEMARU, E.; SHIMURA, S.; AMANO, K.; KARASAWA, T. Antibacterial activity of honey from stingless bees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). **Polish Journal Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 281 – 285, 2007.
- TERRAB, A.; DÍEZ, M. J.; HEREDIA, F. J. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 373 – 379, 2002.
- TORNUK, F.; KARAMAN, S.; OZTURK, I.; TOKER, O. S.; TASTEMUR, B.; SAGDIC, O.; DOGAN, M.; KAYACIER, A. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 124–131, 2013.
- TURHAN, I.; TETIK, N.; KARHAN, M.; GUREL, F.; TAVUKCUOGLU, H. R. Quality of honeys influenced by thermal treatment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1396–1399, 2008.
- TURKMEN, N.; SARI, F.; POYRAZOGLU, E. S.; VELIOGLU, Y. S.; Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 653 – 657, 2006.
- TYSSET, C.; ROUSSEAU, M. Problem of microbes and hygiene of commercial honey. **Medicine Veterinary**, v. 132, p. 591–600, 1981.
- VANHANEN, L. P. A.; EMMERTZ, G. P. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. **Food Chemistry**, v. 128, p. 236–240, 2011.
- VASQUEZ, A. Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. **Plos One**, 2012.
- VÁZQUEZ-QUIÑONES, C.R.; MORENO-TERRAZAS, R.; NATIVIDAD-BONIFACIO, I.; QUIÑONES-RAMÍREZ, E.I.; VÁZQUEZ-SALINAS, C. Microbiological assessment of honey in México. **Rev. Argent. Microbiol**, v. 50, p. 75–80, 2018.
- VIDAL, R.; FREGOSI, E. V. Mel: características, análises físico-químicas, adulteração e transformação. Barretos: **Instituto Tecnológico Científico "Roberto Rios"**, 1984.
- VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012.

VIT, P.; MEDINA, M.; ENRIQUEZ, M. E. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. **Bee World**, v. 85, n. 1, p. 2-5, 2004.

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees. 1<sup>a</sup> ed. **Springer -Verlag**, New York, 2013.

VIT, P.; BOGDANOV, S.; KILCHENMAN, V. Composition of Venezuelan honey of stingless bees (Apidae: Meliponinae) and *Apis mellifera* L. **Apidologie**, v. 25, n. 3, p. 278 – 288, 1994.

WHITE, J. W. The role of HMF and diastase assays in the evaluation of honey quality. **Bee World**, v. 75, p. 104 – 117, 1994.

WHITE, J. W.; KUSHNIR, I.; SUBERS, M. H. Effect of storage and processing temperatures on honey quality. **Food Technology**, v. 18, p. 153 – 156, 1964.

WHO. World Health Organization. **Botulism**. 10 January 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>>. Acesso em: 10 Fev. 2019.

YUCEL, Y. E SULTANOGLU, P. Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1–2, p. 231–237, 2013

ZHAO, H.; NI, C.; YING, Z.; ZHENG, S.; WENQI, Z.; YIN, W.; WEI, C. The effects of different thermal treatments on amino acid contents and chemometric-based identification of overheated honey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p.133–139, 2018.

ZINOVIADOU, K. G.; GALANAKIS, C. M.; BRNČIĆ, M.; GRIMI, N.; BOUSSETTA, N.; MOTA, M. J.; SARAIVA, J. A.; PATRAS, A.; TIWARI, B.; BARBA, F. J. Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. **Food Research International**, v. 77, n. 4, p. 743-752, 2015.