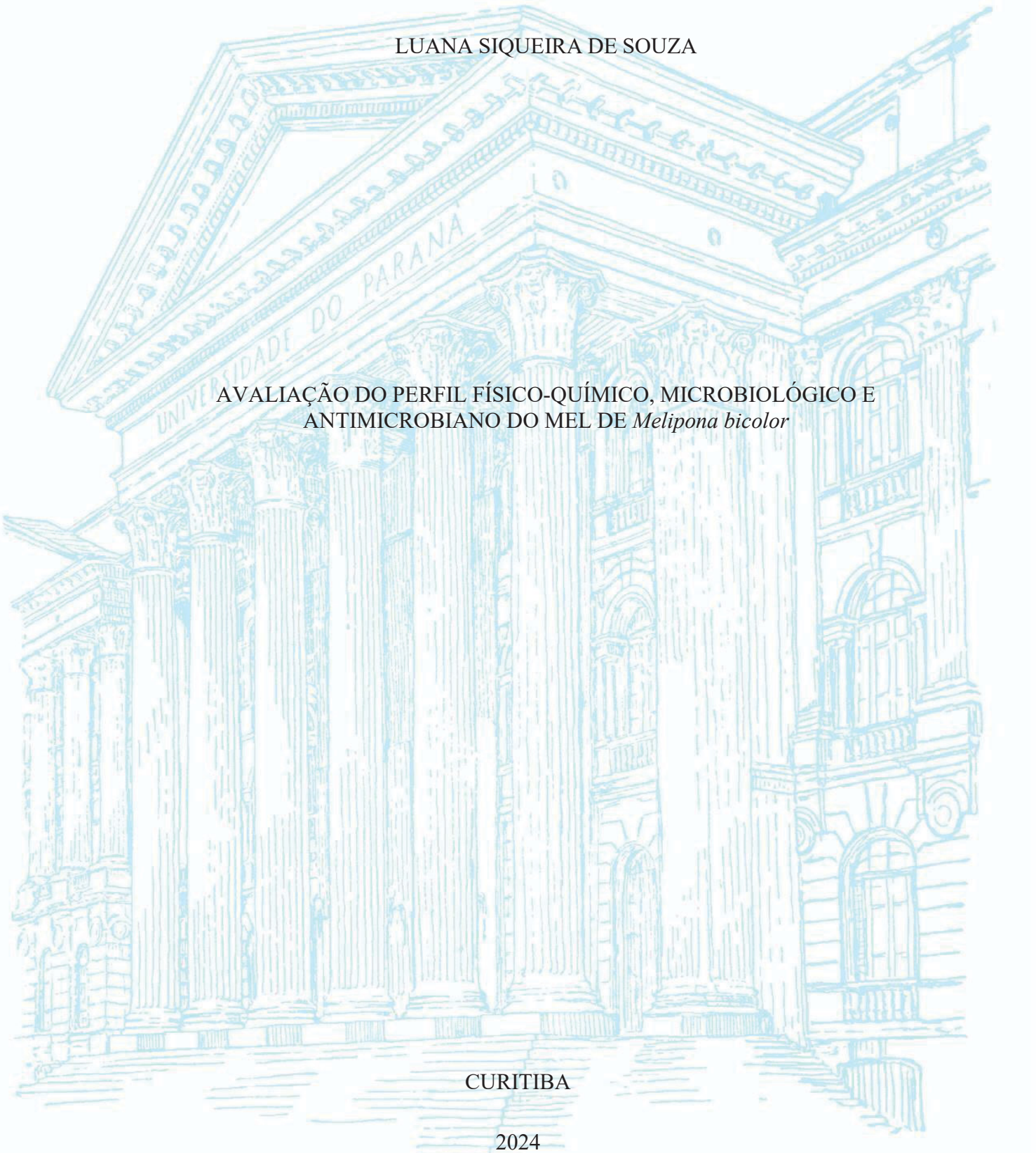
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA SIQUEIRA DE SOUZA



AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, MICROBIOLÓGICO E ANTIMICROBIANO DO MEL DE *Melipona bicolor*

CURITIBA

2024

LUANA SIQUEIRA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, MICROBIOLÓGICO E ANTIMICROBIANO DO MEL DE *Melipona bicolor*

Material apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Saúde Única, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Julia Arantes Galvão

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Souza, Luana Siqueira de
Avaliação do perfil físico-químico, microbiológico e antimicrobiano de mel de Melipona bicolor / Luana Siqueira de Souza. – Curitiba, 2024.
1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Orientadora: Julia Arantes Galvão

1. Abelhas sem ferrão. 2. Melipona. 3. Mel. 4. Segurança alimentar. I. Galvão, Julia Arantes. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

Bibliotecária: Elizabeth de Almeida Licke da Luz CRB-9/1434

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LUANA SIQUEIRA DE SOUZA** intitulada: **AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, MICROBIOLÓGICO E ANTIMICROBIANO DO MEL DE *Melipona bicolor***, sob orientação da Profa. Dra. JULIA ARANTES GALVÃO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 30 de Julho de 2024.

Assinatura Eletrônica
31/07/2024 09:06:32.0
JULIA ARANTES GALVÃO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
31/07/2024 10:24:14.0
VIRGÍNIA FARIAS ALVES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS)

Assinatura Eletrônica
31/07/2024 08:56:50.0
TOMAZ LONGHI SANTOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 385415
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 385415

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar e amparar em todos os momentos, à minha família por todo apoio, em especial aos meus pais Luiz, Ludimilson e Alessandra, que desde o início da graduação me incentivaram a fazer parte da pesquisa, à minha avó Maria, tias Déborah, Chris e Cíntia por me acolherem quando cheguei em Curitiba. Sou grata a todos que estiveram comigo no processo de transição da Graduação para o Mestrado, sempre acreditando e torcendo por mim. Sou grata pela força, coragem e resiliência que há em mim, atributos esses que foram essenciais para que, em momento algum, eu pensasse em desistir, mesmo em meio aos contratempos. Toda a minha admiração e respeito à minha orientadora, Professora Júlia, um dos seres humanos mais incríveis que já conheci, a quem agradeço imensamente pelo acolhimento, compreensão, por todo o suporte e, principalmente, por me dar a oportunidade de realizar um sonho, que muito além de um Mestrado, permitiu que eu me reencontrasse. O LACQSA é mais que um laboratório, é um lar. E que alegria poder dividir o mesmo ambiente de trabalho com pessoas tão maravilhosas, como a Juliana, que foi nosso braço direito por um breve momento, Elisana e Eduardo, que me apoiaram desde o início, Vitor, Bruno e Giovana, colegas de Mestrado que se tornaram especiais para mim mesmo com pouco tempo de convívio, Bárbara, a estagiária que faz o melhor café do mundo, Edson Bruno, Maria, Júlia, Tiago, Marina e Vinícius, todos vocês têm a minha admiração. Sou grata pelas amizades que o Mestrado me deu, em especial às minhas amigas Amanda e Júlia, que sempre me impulsionam e me alentam com entusiasmo. Quero agradecer, também, ao meu comitê de orientação, Professor Molento, alguém por quem tenho muito carinho e admiração, e à Professora Juliana, que sempre nos contagia com sua alegria. Agradeço ao seu Benedito e à dona Salete do Abelha Brasil por contribuírem diretamente com a realização deste trabalho. Meus agradecimentos à Universidade Federal do Paraná, local em que fui gerada no ventre da minha mãe e convivi os primeiros três anos da minha vida, por proporcionar oportunidades incríveis que nos permitem crescer e evoluir em diferentes âmbitos. Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

“Tendo em conta as condições de que dispõe e na medida do possível, é a natureza que faz sempre as coisas mais belas e melhores.”

Aristóteles

RESUMO

O mel de abelhas sem ferrão possui composição química diferenciada, com a presença de nutrientes e compostos bioativos que podem conferir propriedades terapêuticas, incluindo atividade antimicrobiana. Por outro lado, cepas bacterianas ameaçam a cadeia de produção de alimentos devido à sua capacidade em adquirir genes de resistência e se disseminar com facilidade, tornando seu controle um desafio considerável à indústria alimentícia mundial. Com isso, é emergente a busca pelo desenvolvimento de métodos alternativos para o controle microbiano. Diversos estudos vêm sendo realizados comprovando o efeito antimicrobiano do mel de abelha sem ferrão, no entanto são escassos os estudos relativos ao mel de *Melipona bicolor*. Portanto, objetivo desta pesquisa foi caracterizar o perfil físico-químico e microbiológico do mel de *Melipona bicolor*, bem como investigar a atividade antimicrobiana do produto frente à cepas de salmonela e estafilococos. Para isso foi coletado mel da abelha *Melipona bicolor* em três meliponários distintos localizados na Região Metropolitana de Curitiba-PR e avaliados quanto ao teor de umidade, açúcares redutores, açúcares totais, sacarose aparente, pH, atividade de água e teor de hidroximetilfurfural. A avaliação microbiológica dos produtos envolveu a quantificação de microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes e bolores e leveduras. Além disso, as amostras foram testadas frente à isolados bacterianos de *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* pelos métodos de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e *Time Kill Assay* (TKA) para avaliação do seu potencial antimicrobiano. O resultado médio de teor de umidade foi de 68,03%, açúcares redutores 62,96%, açúcares totais 65,5%, sacarose aparente 2,6%, pH 2,95, atividade de água 0,67. Não foram detectadas quantidades significativas de HMF no mel das três propriedades analisadas. A contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e bolores e leveduras indica que o mel está de acordo dos padrões estabelecidos pelos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade para Mel de Abelha Sem Ferrão no Brasil. Foi constatada ação bacteriostática do produto por meio da CIM na concentração de 1%. Por meio do TKA verificou-se que a ação antimicrobiana ocorreu no Tempo Zero com a concentração de 0,5% frente à *S.* Heidelberg. Diante disso, podemos concluir que o mel de *Melipona bicolor* está adequado para consumo e apto para comercialização e possui potencial antimicrobiano contra isolados bacterianos de *S.* Heidelberg.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão. Meliponicultura. Concentração inibitória Mínima. Atividade antimicrobiana. *Time Kill Assay*. Qualidade. Segurança de Alimentos.

ABSTRACT

Stingless bee honey has a different chemical composition, with the presence of nutrients and bioactive compounds that can confer therapeutic properties, including antimicrobial activity. On the other hand, bacterial strains threaten the food production chain due to their ability to acquire resistance genes and spread easily, making their control a considerable challenge to the food industry. As a result, the search for the development of methods for microbial control. Several studies have been carried out proving the antimicrobial effect of stingless bee honey. However, studies on *Melipona bicolor* honey are scarce. Therefore, the aim of this research was to characterize the physicochemical and microbiological profile of *Melipona bicolor* honey, as well as to investigate the antimicrobial activity of the product against strains of salmonella and staphylococci. For this purpose, honey from the *Melipona bicolor* bee was collected from three different meliponaries located in the Metropolitan region of Curitiba-PR and evaluated for moisture content, reducing sugars, total sugars, apparent sucrose, pH, water activity and hydroxymethylfurfural content. A microbiological evaluation of the products involved the quantification of aerobic mesophilic microorganisms, total coliforms, thermotolerant coliforms and molds and yeasts. In addition, the samples were tested against bacterial isolates of *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Time Kill Assay (TKA) methods to assess their antimicrobial potential. The average result for moisture content was 68.03%, reducing sugars 62.96%, total sugars 65.5%, apparent sucrose 2.6%, pH 2.95, water activity 0.67. No significant amounts of HMF were detected in the honey from the three properties analyzed. The count of total coliforms, thermotolerant coliforms and molds and yeasts indicates that the honey complies with the standards established by the Technical Regulations of Identity and Quality for Stingless Bee Honey in Brazil. The product's bacteriostatic action was found using the MIC at a concentration of 1%. TKA showed thatthe antimicrobial action occurred at Time Zero with a concentration of 0.5% against *S.*Heidelberg. We can therefore conclude that *Melipona bicolor* honey is suitable for consumption and sale and has antimicrobial potential against bacterial isolates of *S.* Heidelberg.

Keywords: Stingless bee honey. Physical chemistry. Microbiology. Minimum inhibitory concentration. Antimicrobial activity. *Time Kill Assay*. Food safety.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1- Processo de colheita do Mel (A) utilizando uma Máquina Sugadora De Mel (B) seguida pela sua Filtração (C) e Envase em recipiente de vidro previamente esterilizado (D). 20
FIGURA 1.2- Pico do padrão para HMF na concentração 0,01 mg/ml (A); Cromatografia de HPLC de HMF das amostras de mel de M. bicolor das propriedades A: Mata nativa (B), Propriedade B: Mata de reflorestamento (C), Propriedade C: Mata nativa e de refloresta 27
FIGURA 2.1- Processo de colheita do Mel (A) utilizando uma Máquina Sugadora De Mel (B) seguida pela sua Filtração (C) e Envase em recipiente de vidro previamente esterilizado (D). 46
FIGURA 2.2- CIM do Mel de *M. bicolor* frente a *S.* Heidelberg e *S.* Typhimurium 49
FIGURA 2.4- Curva *Time Kill* do mel de *M.bicolor* contra *S.* Heidelberg 50
FIGURA 2.5- Curva *Time Kill* do mel de *M.bicolor* contra *S.* Typhimurium 51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Identificação e locais de colheita das amostras de mel. 17
TABELA 1.2 – Parâmetros físico-químicos do mel de *M. bicolor* coletado em Mandirituba-PR e Fazenda Rio Grande-PR em áreas de mata nativa e de reflorestamento. 24
TABELA 2.1 – Identificação e locais de colheita das amostras de mel. 42

LISTA DE SIGLAS

ARG – Açúcares Redutores De Glicose

ANR – Açúcares Não Redutores

AR – Açúcares Redutores Em Glicose

aW – Atividade de Água

BDA – Ágar Batata Dextrose

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

EC – *Escherichia coli*

HMF – Hidroximetilfurfural

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IR – Índice de Refração

LST – Lauril Sulfato Triptose

NMP – Número Mais Provável

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PCA – Ágar padrão para contagem

RTIQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

SS – Salmonella-Shigella

TKA – Time Kill Assay

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

VBBL – Verde Bile Brilhante Lactose

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO DO MEL DE *Melipona bicolor* 16

1.1 RESUMO 16

1.2 **INTRODUÇÃO** 17

1.2.1 OBJETIVOS 19

1.2.1.1 Objetivo Geral 19

1.3 METODOLOGIA **20**

1.3.1 Obtenção e Processamento das Amostras 20

1.3.2 Parâmetros Físico-Químicos 21

1.3.2.1 Umidade 21

1.3.2.2 Açúcares 22

1.3.2.3 Titulação do branco 22

1.3.2.4 Açúcares Redutores 22

1.3.2.5 Açúcares Totais 23

1.3.2.6 pH 24

1.3.2.7 Atividade de água 24

1.3.2.8 Hidroximetilfurfural 24

1.3.3 Parâmetros Microbiológicos 25

1.3.3.1 Preparo da amostra 25

1.3.3.2 Contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias 26

1.3.3.3 Número mais provável de Coliformes Totais e Termotolerantes 26

1.3.3.4 Contagem de bolores e leveduras 26

1.4 RESULTADOS **27**

1.5 DISCUSSÃO **30**

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS **35**

REFERÊNCIAS **36**

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE *Melipona bicolor* **41**

2.1 RESUMO 41

2.2 INTRODUÇÃO **42**

2.2.1 OBJETIVOS 45

2.2.1.1 Objetivo Geral 45

2.2.1.2 Objetivos Específicos 45

2.3 METODOLOGIA **46**

2.3.2 Cepas microbianas 47

2.3.3 Concentração Inibitória Mínima 48

2.3.4 Concentração Bactericida Mínima 48

2.3.5 *Time Kill Assay* 49

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **50**

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 56

REFERÊNCIAS 57

INTRODUÇÃO

Pertencentes à ordem Hymenoptera e à subfamília Meliponinae, as abelhas sem ferrão possuem uma ampla diversidade de formas e tamanhos e estão presentes em toda a região tropical e subtropical do mundo, possuindo mais de 400 espécies (VILLAS BÔAS, 2012). São caracterizadas por apresentarem o ferrão atrofiado, possuindo outros mecanismos de defesa desenvolvidos ao longo do seu processo evolutivo. Os meliponíneos são fundamentais para a polinização, atuando em 80% da vegetação natural, sendo polinizadores exclusivos de 65% delas (CELLA *et al*., 2017; MICHENER, 2007).

No Brasil, até 1839, existiam apenas abelhas nativas sem ferrão. Sua criação era realizada pelos povos indígenas, que tinham o mel como principal adoçante e fonte de energia. Após a chegada dos portugueses no Brasil, a cana-de-açúcar foi introduzida substituindo o mel. Em 1839, introduziu-se a abelha *Apis mellifera*, cessando de vez a cultura das abelhas indígenas, que foi retomada apenas no século XX, recebendo o nome de meliponicultura (NOGUEIRA NETO, 1997). A meliponicultura é uma indústria em ascensão nos países tropicais e, além dos serviços de polinização, os produtos apícolas, como mel, própolis, resina e pólen, são essenciais para a alimentação humana, saúde e segurança alimentar (ENGEL, 2023).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é identificada como uma das ameaças globais mais graves à saúde pública atualmente (WHO, 2023; AIJAZ *et al*., 2023). O uso constante e indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e animal é o principal fator responsável por gerar essa resistência, levando a incapacidade dos antimicrobianos de combater microrganismos, sendo prevista a perda total de sua eficácia até o ano de 2050 (MWANGI *et al*., 2024). Diante disso, se faz nececessária a busca por novos compostos, capazes de controlar a propagação de microrganismos resistentes, especialmente aqueles associados à quadros infecciosos em seres humanos e animais (ARDAKANI *et al*., 2023; PULINGAM *et al*., 2022).

Nesse contexto, a atividade antimicrobiana é um dos atributos do mel de *Melipona* spp., podendo inibir o crescimento de patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*, entre outros (SOUSA, 2016; PIMENTEL *et al*., 2013). Dentre as espécies de abelhas sem ferrão, a *Melipona bicolor*, popularmente chamada de Guaraipo, é uma espécie ameaçada de extinção (ÁVILA *et al*., 2018). Conhecida pela sua importância na polinização de plantas, produção de mel e preservação da biodiversidade, o mel produzido por essa espécie é valorizado por suas características singulares e sabor único.

Também possui composição química diferenciada, com a presença de carboidratos, aminoácidos, vitaminas, minerais e compostos bioativos, que podem conferir propriedades terapêuticas, como atividade antioxidante e antimicrobiana (BILUCA *et al*., 2017; KHONGKWANMUEANG *et al*., 2020).

No entanto, são escassos na literatura estudos que caracterizem o mel de *Melipona bicolor* e avaliem seu potencial antimicrobiano. Com isso, o objetivo desse trabalho é avaliar o perfil físico-químico do mel de *Melipona bicolor*, incluindo umidade, teor de açúcares redutores, açúcares totais e sacarose aparente, pH, atividade de água e teor de hidroximetilfurfural, e avaliar o seu perfil microbiológico, incluindo contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias, número mais provável de coliformes totais e termotolerantes e contagem de bolores e leveduras, bem como investigar sua atividade antimicrobiana frente à cepas selvagens de *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* pertencentes ao acervo do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

Neste trabalho, cada capítulo segue a formatação de uma revista específica, o que esclarece a estrutura própria de cada artigo.

CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DO PERFIL FÍSICO-QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO DO MEL DE *Melipona bicolor*

1.1 RESUMO

O mel de abelha sem ferrão vem despertando interesse entre os consumidores devido à sua grande variedade, características sensoriais, propriedades terapêuticas e alto valor agregado. Diversos estudos vêm sendo realizados com mel de abelhas nativas, no entanto são escassos os estudos relativos ao mel de *Melipona bicolor*. Portanto, objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil físico-químico e microbiológico do mel de *Melipona bicolor* frente à legislação vigente no Brasil. Para isso foi coletado mel da abelha *Melipona bicolor* em três meliponários distintos localizados na Região Metropolitana de Curitiba-PR e avaliados quanto ao teor de umidade, açúcares redutores, açúcares totais, sacarose aparente, pH, atividade de água e teor de hidroximetilfurfural (HMF). Quanto ao perfil microbiológico, foi realizada contagem de bactérias mesófilas aeróbias, número mais provável de coliformes totais e termotolerantes, contagem de bolores e leveduras. O resultado médio de teor de umidade foi de 24,8%, açúcares redutores 62,96%, açúcares totais 65,6% e sacarose aparente 2,6%, pH 2,95 e atividade de água 0,67. Não foram detectadas quantidades significativas de HMF no mel das três propriedades analisadas. Os resultados da contagem de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes totais e termotolerantes e contagem de bolores e leveduras, juntamente aos resultados das análises dos parâmetros físico-químicos, indicaram que o mel de *M. bicolor* analisado nesse estudo está de acordo com os Padrões de Identidade e Qualidade impostos pela Legislação Estadual para Meliponicultura, logo, está adequado para consumo e apto para comercialização.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão. Meliponíneos. Qualidade. Segurança de Alimentos.

1.2 INTRODUÇÃO

Pertencentes à ordem Hymenoptera e à subfamília Meliponinae, as abelhas sem ferrão possuem uma ampla diversidade de formas e tamanhos e estão presentes em toda a região tropical e subtropical do mundo, possuindo mais de 400 espécies (BRAGHINI *et al*., 2022; VILLAS BÔAS, 2012). São caracterizadas por apresentar o ferrão atrofiado, possuindo outros mecanismos de defesa desenvolvidos ao longo do seu processo evolutivo. Os meliponíneos são fundamentais para a polinização, atuando em 80% da vegetação natural, sendo polinizadores exclusivos de 65% delas (CELLA *et al*., 2017; MICHENER, 2007).

A meliponicultura é uma atividade em ascensão nos países tropicais e, além dos serviços de polinização, os produtos apícolas, como mel, própolis, resina e pólen, são essenciais para a alimentação humana, saúde e segurança alimentar (ENGEL, 2023). Quanto ao mel, suas características particulares e propriedades diferenciadas têm o tornado um objeto de estudo de grande interesse entre os pesquisadores, além de atrair consumidores de diferentes regiões do mundo, elevando seu valor comercial. Possuindo inúmeras variedades, esses méis diferenciam-se entre si não só pela espécie de abelha que os produziu, mas também pela composição botânica local e condições edafoclimáticas (NORDIN *et al*., 2018; EMBRAPA, 2023).

No Brasil, a diversidade de biomas, diferenças de temperatura e umidade e abundante composição da flora local influenciam nas propriedades do mel de cada região, impedindo a padronização de uma legislação que represente a realidade de modo geral (NORDIN *et al*., 2018). Consequentemente, a impossibilidade de atingir os parâmetros estabelecidos dificulta a comercialização do mel por parte dos produtores nos locais que possuem legislação. Além disso, possibilita a ocorrência de fraudes, colocando em risco a saúde do consumidor (SPINK *et al*., 2019). Nesse sentido, é fundamental a realização da caracterização do mel de abelhas sem ferrão, correlacionando com a espécie da abelha e as características do local onde o meliponário se encontra (BILUCA *et al*, 2016).

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão, a *Melipona bicolor*, popularmente chamada de Guaraipo, é conhecida pela sua importância na polinização de plantas, produção de mel e preservação da biodiversidade (ÁVILA et al., 2018). Além disso, o mel produzido por essas abelhas é valorizado por suas características singulares e sabor único, possuindo sabor mais ácido e textura mais fluida, se comparado com o mel de *Apis mellifera* (BILUCA *et al*., 2017; FALEIROS-QUEVEDO & FRANCOY, 2022).

Com uma produção anual de cerca de 2 kg e preferência floral seletiva, essas abelhas estão predominantemente presentes na região sul e sudeste do Brasil, mais especificamente no bioma Mata Atlântica, possuindo ninhos construídos em cavidades de árvores, geralmente mais próximos ao solo ou à base do tronco, tornando difícil a sua percepção (NOGUEIRA-NETO, 1997). Também apresentam poliginia, que consiste na presença de mais de uma rainha no mesmo ninho, algo raro entre as abelhas sem ferrão (ALONSO *et al*., 1998). Todos esses fatores, aliados ao potencial terapêutico atribuído ao mel de abelhas sem ferrão, tornam esse um produto precioso e relativamente raro, sendo valorizado no mercado nacional e internacional (PIMENTEL *et al*., 2021; BRAGHINI *et al*., 2022).

No entanto, é importante observar que são escassos os relatos na literatura acerca da caracterização do mel de *Melipona bicolor.* Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos do mel da abelha *Melipona bicolor* coletados em três propriedades distintas localizadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR e comparar com os parâmetros recomendados pela legislação vigente, no intuito de investigar a padronização e qualidade do produto, constatando se este mel está adequado para consumo e apto para comercialização.

1.2.1 OBJETIVOS

1.2.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil físico-químico e microbiológico do mel de *Melipona bicolor* coletado em três meliponários distintos localizados na Região Metropolitana de Curitiba-PR e comparar com os parâmetros recomendados pela legislação vigente, visando verificar a qualidade do produto, constatando se o mesmo está adequado para comercialização e apto para consumo.

1.2.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil físico-químico do mel de *Melipona bicolor.*
- Avaliar o perfil microbiológico do mel de *Melipona bicolor.*
- Comparar os resultados com os parâmetros recomendados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha sem Ferrão para o Estado do Paraná.

1.3 METODOLOGIA

1.3.1 Obtenção e Processamento das Amostras

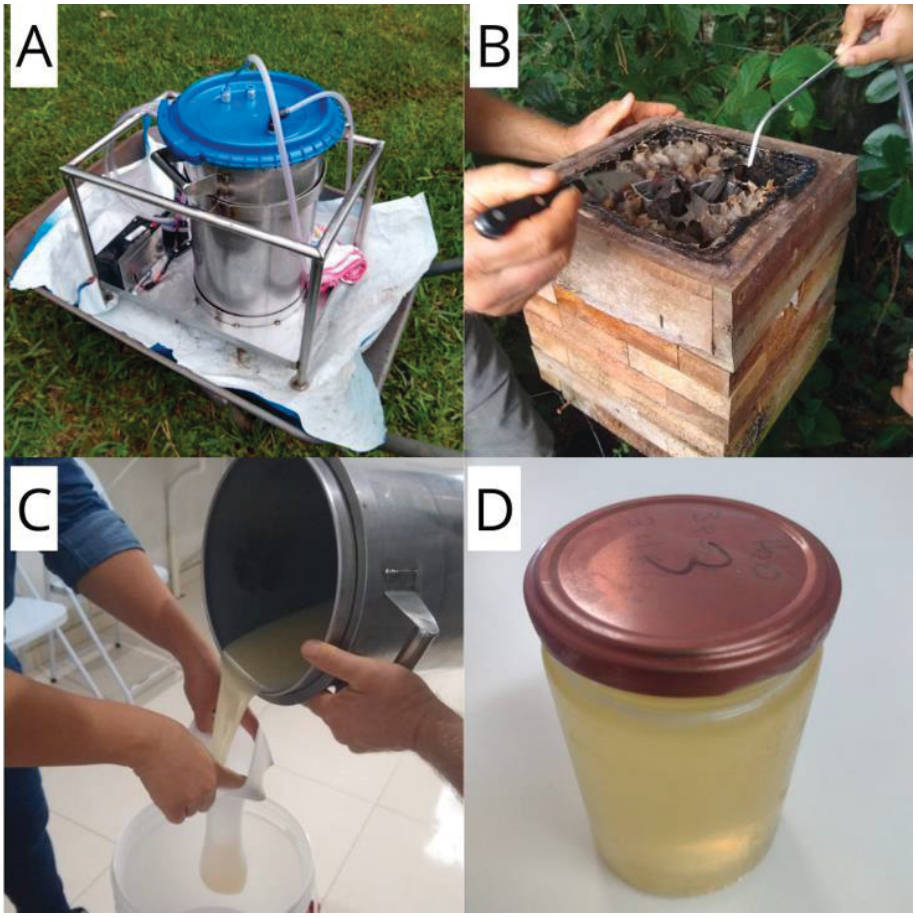
Foi realizada a colheita de mel da abelha *Melipona bicolor* (Cadastro SisGen A0818FE) na Região Metropolitana de Curitiba-PR, em três meliponários distintos localizados em propriedades privadas, em 23 de fevereiro de 2023. A primeira colheita foi realizada em uma propriedade localizada em Mandirituba, totalizando 2,053 kg de mel. A segunda colheita foi realizada em local situado em Fazenda Rio Grande, totalizando 2,312 kg. No terceiro local de colheita, também localizado em Mandirituba, foram obtidos 2,283 kg de mel (TABELA 1.1). As matas dos três locais de colheita são caracterizadas como formações secundárias em estágio médio e avançado. Os méis foram coletados de, em média, quatro a seis módulos de cada propriedade. Não houve alimentação prévia das abelhas por se tratar de um período no fim do verão, visto que, no verão, há um aumento do nível de produção de mel pelas abelhas.

Todas as colheitas foram realizadas por meio de sucção, utilizando uma máquina sugadora de mel que consiste em um pequeno tanque com uma mangueira que funciona a base de pressão (FIGURA 1.1 A), desenvolvida pelos produtores Benedito Perin Uczai e Salete Perin Uczai. Primeiramente, realizou-se a limpeza externa das caixas, seguida pela retirada da tampa e lona, e posteriormente pela perfuração dos potes com o auxílio de uma faca. Após a perfuração, o cano da mangueira era posicionado no interior dos potes, realizando a sucção do mel (FIGURA 1.1 B). Após a colheita, foi realizada a filtração dos méis, utilizando tecido fio 40 (92% Poliamida, 8% Elastano) (FIGURA 1.1 C), seguida pelo envase desses méis em recipientes de vidro previamente esterilizados, que foram transportados sob refrigeração até o laboratório e armazenados no refrigerador a 4ºC até o momento das análises (FIGURA 1.1 D). O tempo máximo de armazenamento foi de 14 meses, sendo as análises realizadas dentro desse período. As amostras foram identificadas de acordo com o local de coleta (A, B, C).

TABELA 1.1 – Identificação e locais de colheita das amostras de mel.

Identificação	Cidade de colheita	Coordenadas
A	Mandirituba	-25.874460, -49.404861
B	Fazenda Rio Grande	-25.724054, -49.300099
C	Mandirituba	-25.803695, -49.303595

FIGURA 1.1- Máquina Sugadora De Mel (A); Processo de colheita do Mel (B); Filtração (C); Envase em recipiente de vidro previamente esterilizado (D).



Fonte: Os Autores (2024)

1.3.2 Parâmetros Físico-Químicos

As três amostras foram avaliadas quanto a umidade, determinação de açúcares redutores, açúcares totais e sacarose aparente, pH, atividade de água (Aw) e determinação do teor de Hidroximetilfurfural (HMF).

1.3.2.1 Umidade

O índice de umidade foi determinado em duplicata com o uso de um Refratômetro de Abbé (AOAC, 2000) pertencente ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos da UFPR. Uma amostra de mel de cada uma das três propriedades foi selecionada, retirada do refrigerador e mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente. Com o

auxílio de uma pipeta de pasteur, uma pequena quantidade de mel foi posicionada no prisma de leitura. Após os ajustes de foco e calibração serem realizados, obteve-se o índice de umidade, determinado pelo índice de refração (IR).

1.3.2.2 Açúcares

A determinação de açúcares totais, açúcares redutores e a sacarose aparente em mel foi realizada pelo método Lane-Enyon (1923), também conhecido como método titulométrico com soluções de Fehling A e B (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), cujo princípio consiste na redução completa dos íons cúpricos a óxido cuproso, sob ação do calor em meio alcalino, realizada pelos açúcares redutores. Para a realização do procedimento, foram selecionadas três amostras, sendo uma de cada localidade. As análises de açúcares foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da UFPR.

Inicialmente, pesou-se 5 g de amostra de mel em um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada. Foram pipetados 50 mL dessa solução em um balão volumétrico de 100 mL, seguidos pela adição de 2 mL de acetato neutro de chumbo e uma ponta de espátula de carvão ativo (Merk®, Alemanha), sendo agitada e deixada em repouso por 10 minutos. O volume foi completado com água destilada. O conteúdo do balão volumétrico foi filtrado sobre 0,4 g de fosfato monoácido de sódio por mililitro de acetato de chumbo adicionado, em um erlenmeyer de 250 mL, seguido de uma segunda filtração sem o uso do fosfato monoácido de sódio.

1.3.2.3 Titulação do branco

Para realizar a titulação do branco, em um erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 20 mL de solução de Soxhlet (10 mL de Fehling A + 10 mL de Fehling B), 45 mL de água destilada, 19 mL da solução padrão de glicose e pérolas de vidro, levando o frasco a aquecimento até sua ebulição em um tempo máximo de quatro minutos. Após sua ebulição, adicionou-se três gotas de azul de metileno. Um minuto após o início da ebulição foi realizada a titulação com solução de glicose até o desaparecimento da coloração azul. Repetiu-se o procedimento até que os resultados em duplicata fossem iguais.

1.3.2.4 Açúcares Redutores

Para a titulação prévia da amostra, em um erlenmeyer de 250 mL com 20 mL da solução de Soxhlet foram adicionados 45 mL de água destilada e 5 mL de amostra de mel. Após aquecimento e ebulição, foi realizada a titulação com solução de glicose até o desaparecimento da coloração azul. Foram adicionadas duas gotas de azul de metileno, continuando com a titulação após um minuto até o total desaparecimento da coloração azul. O volume de solução de glicose gasto foi considerado como K.

A titulação da amostra segue o mesmo princípio da titulação prévia, com a diferença de que a solução de glicose adicionada é considerada como sendo K-2. O procedimento foi repetido até que se obtivessem resultados iguais em duplicata.

1.3.2.5 Açúcares Totais

Para realizar a hidrólise das amostras, foram pipetados 50 mL da amostra clarificada em um balão volumétrico de 100 mL, seguidos pela adição de 1 mL de ácido clorídrico, sendo mantido em banho-maria a 67°±3 durante 15 minutos. Em seguida, após o resfriamento do conteúdo do balão volumétrico à temperatura ambiente, foi realizada a neutralização por meio da adição de 2,8 mL de hidróxido de sódio 5 N com o auxílio de papel tornassol como indicador. Após completar o volume do balão com água destilada, foram realizadas as titulações seguindo o princípio dos açúcares redutores, no entanto, foi utilizada a solução de açúcares invertidos.

Os resultados foram expressos em g/100 g utilizando as seguintes fórmulas:

$$ARG = \frac{(b-a)}{10\,.\,v}\cdot 5\cdot f1\cdot f2$$

$$ANR = [\frac{(b-a)\cdot 5\cdot\ (f1\ \cdot 2)}{10}\cdot v - AR]\cdot f2$$

Sendo ARG os açúcares redutores de glicose, ANR os açúcares não redutores e AR os açúcares redutores em glicose. O $f1$ representa todas as diluições e as grandezas de massa ou volume utilizadas, $f2$ representa o fator de conversão para expressão dos resultados em glicose, a representa o número de mL da solução de glicose gastos na titulação da amostra, b equivale ao número de mL da solução de glicose gastos na titulação do branco e v é o volume

da amostra preparada usado na titulação, em mL.

Para expressar os açúcares totais, foi realizada a soma de AR em glicose mais ANR em sacarose. Os açúcares em sacarose foram expressos utilizando a fórmula: Açúcares Totais em Sacarose = (AR em glicose x 0,96) + ANR em sacarose.

Para expressar os açúcares totais em glicose foi utilizada a seguinte fórmula: Açúcares Totais em Glicose = AR em glicose + (ANR em sacarose ÷ 0,96).

1.3.2.6 pH

A avaliação do pH foi realizada de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Para medir o pH das amostras de mel, foi utilizado um pHmetro de bancada Luca-210 (São José do Rio Preto-SP) pertencente ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos da UFPR. Após a calibração com soluções tampões pH 4,0 e 7,0, seu eletrodo foi inserido diretamente no tubo contendo mel, revelando seu pH. Foi realizada a medição do pH de cada amostra em duplicata. Para a realização do procedimento, foram selecionadas três amostras, sendo uma de cada propriedade.

1.3.2.7 Atividade de água

Para a avaliação da atividade de água (Aw) das amostras, foi utilizado o dispositivo portátil HP 23aw ROTRONIC, pertencente ao Laboratório de Nutrição Animal da UFPR, sendo colocado aproximadamente 2 mL da amostra em um porta-amostras de aço inoxidável, conectado a uma sonda de medição. As análises foram realizadas em duplicata para cada uma das três amostras (AOAC, 2000).

1.3.2.8 Hidroximetilfurfural

A análise quantitativa de hidroximetilfurfural foi realizada no Centro de Estudos em Biofarmácia da UFPR pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando um cromatógrafo Agilent 1100 Series (Waldbronn, Germany), composto por uma bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1379A, injetor automático G1320A e detector de fotodiodo G1315B conforme descrito pot Jeuring & Kuppers (1980). Inicialmente, 10 g de mel foram diluídos em 50 mL com água destilada. A solução padrão foi preparada diluindo

100 mg de 5-(Hydroxymethyl) furfural (Merck®, China) para 1000 mL com água destilada. Em seguida 10 mL dessa solução foi diluída para 100 mL, resultando em uma solução padrão de 0,01 mg/mL^{-1}. As soluções resultantes das amostras e do padrão foram filtradas, em filtro de membrana de 0,45 µm. A análise cromatográfica ocorreu de modo isocrático, utilizando-se como fase móvel metanol (Merck®, Alemanha) e água Milli-Q, na proporção 90:10 (v/v); com volume de injeção de 20 µL; fluxo de 1,0 mL/min; coluna XBridge™, C18, 5 µm, 4,6x150 mm; detecção em 285 nm.

A quantificação das concentrações de HMF das amostras foi feita comparando as alturas dos picos amostrais com as alturas dos picos correspondentes ao padrão de HMF, então foi utilizada a seguinte fórmula para obtenção dos resultados:

$$\text{HMF (mg/kg)} = \frac{\text{C} \cdot \text{PH} \cdot \text{x}}{\text{PH'}} \cdot \text{W}$$

Sendo C a concentração do padrão mg/L, PH a altura do pico desconhecido, PH' a altura do pico do padrão, W o peso da amostra em gramas e x o fator de diluição. Para a realização do procedimento, foram selecionadas três amostras, sendo uma de cada propriedade.

1.3.3 Parâmetros Microbiológicos

Foram realizadas contagem padrão em placas de bactérias mesófilas, número mais provável de coliformes totais e termotolerantes e contagem de bolores e leveduras. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos da UFPR.

1.3.3.1 Preparo da amostra

Foi selecionado um tubo de cada amostra (A, B e C) contendo 25 mL de mel, que foram adicionados in vitro à 225 mL de solução salina (0,9%) peptonada tamponada (0,1%), obtendo assim a primeira diluição (10^{-1}). Para realizar as diluições subsequentes (10^{-2} a 10^{-7}), foram utilizados tubos contendo 9 mL do mesmo diluente (ISO 4833-1: 2013; ISO 4833-2: 2014)

1.3.3.2 Contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias

Para contagem de bactérias mesófilas aeróbias, as diluições foram distribuídas em placas de Petri com ágar padrão para contagem (PCA) (Oxoid Ltd. Basingstoke – Reino Unido), sendo incubadas a 35±2°C por 48 horas. Os valores foram expressos em Log UFC/mL^{-1} (Ryser & Schuman, 2015).

1.3.3.3 Número mais provável de Coliformes Totais e Termotolerantes

Para analisar a presença de coliformes, foram utilizados tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Oxoid Ltd. Basingstoke – Reino Unido) com a presença de um tubo de Duhran invertido no interior de cada tubo. Foram pipetados 1,0 mL de cada diluição das amostras nos tubos, seguidos pela homogeneização e incubação a 35±2°C/48 h. Os tubos positivos foram transferidos para tubos com Caldos Verde Bile Brilhante Lactose (Kasvi - Itália) e EC (*Escherichia coli*) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. - Mumbai, Índia) e incubados a 36 e 44,5°C, respectivamente, durante 48 h. O resultado foi expresso em NMP/mL^{-1} (SALFINGER & TORTORELLO, 2015; RICE *et al*., 2012; WEHR & FRANK, 2004).

1.3.3.4 Contagem de bolores e leveduras

Para contagem de bolores e leveduras, foram inoculados 0,1 mL de cada diluição em placas de Ágar Batata Dextrose (BDA) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. - Mumbai, Índia) acidificado com ácido tartárico 10% (Neon – Suzano, São Paulo), espalhando com uma alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas a 25ºC durante cinco dias. Para a contagem de colônias e cálculo dos resultados, foram selecionadas as placas com 10 a 150 colônias. Os resultados foram multiplicados pelo seu fator de diluição correspondente e expressos em Log UFC/mL^{-1} (SALFINGER & TORTORELLO, 2015; PITT & HOCKING, 2009; WEHR & FRANK, 2004).

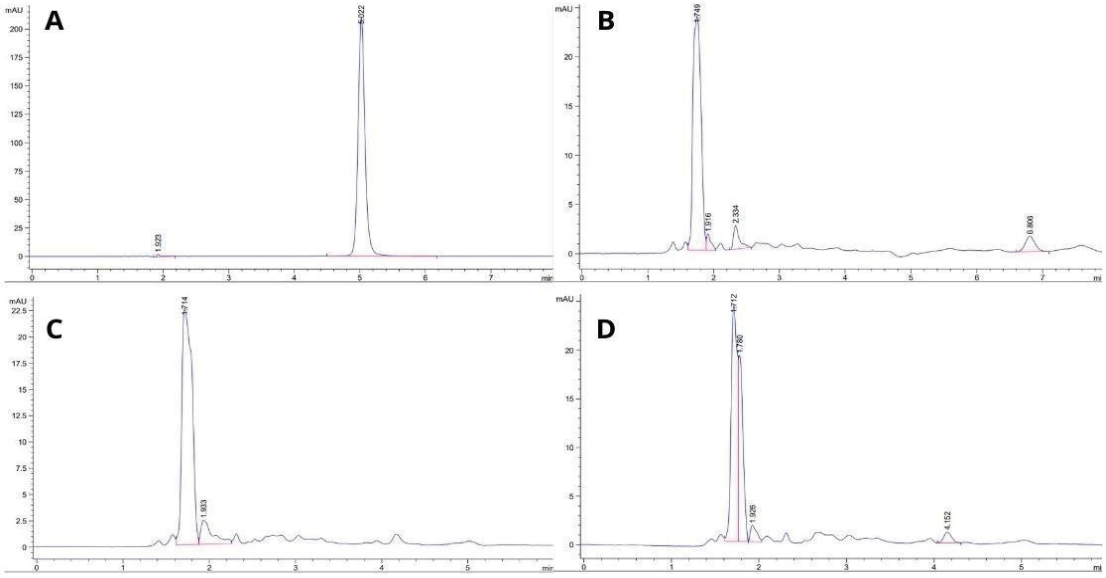
1.4 RESULTADOS

O mel das três localidades apresentou umidade equivalente a $\bar{x}$=24,76%, açúcares redutores $\bar{x}$=62,96%, açúcares totais $\bar{x}$=65,6% e sacarose aparente $\bar{x}$=2,6%, pH $\bar{x}$=2,95, atividade de água $\bar{x}$=0,67 (TABELA 1.2). Não foram detectadas quantidades significativas de HMF no mel das três localidades analisadas (FIGURA 1.2).

TABELA 1.2 – Parâmetros físico-químicos das amostras de mel de *Melipona bicolor* coletadas em matas constituídas de formações secundárias em estágio médio e avançado, localizadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR (A-25.874460, -49.404861; B: -25.724054, -49.300099; C:-25.803695, -49.303595).

Parâmetros físico-químicos/Amostra	**A**	**B**	**C**	**Média**
Umidade	24,8%	24,7%	24,8%	24,76%
Açúcares redutores	63,36%	61,52%	64%	62,96%
Açúcares totais	66,8%	64,8%	65,28%	65,6%
Sacarose aparente	3,4%	3,3 %	1,3%	2,6%
pH	3,07	2,84	2,96	2,95
Atividade de água	0,644	0,689	0,677	0,67
HMF	Ausente	Ausente	Ausente	–

FIGURA 1.2 Pico do padrão para HMF na concentração 0,01 mg/ml (A); Cromatografia de HPLC de HMF das amostras de mel de *Melipona bicolor* coletadas em matas constituídas de formações secundárias em estágio médio e avançado, localizadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR (B-25.874460, -49.404861; C: -25.724054, -49.300099; D:-25.803695, -49.303595).



Fonte: Os Autores (2024)

Quanto aos parâmetros microbiológicos do mel de *Melipona bicolor*, os resultados da contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias foram 3,29 (A), 2,46 (B) e 4,08 (C) log UFC/ml. Os resultados para número mais provável de coliformes totais e termotolerantes encontrados foram ≤ 3 NMP/mL para todas as amostras. A contagem de bolores e leveduras foram 2,43 log UFC/ml para o mel da localidade A e 1,78 log UFC/ml para o mel da localidade B, sendo observada a ausência de bolores e leveduras no mel da localidade C (TABELA 1.3).

TABELA 1.3 – Parâmetros microbiológicos das amostras de mel de *Melipona bicolor coletadas em matas constituídas de formações secundárias em estágio médio e avançado, localizadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR (B-25.874460, -49.404861; C: -25.724054, -49.300099; D:-25.803695, -49.303595).*

Parâmetros Microbiológicos	A	B	C
Bactérias Mesófilas Aeróbias (UFC/mL)	3,29 log	2,6 log	4,08 log
Coliformes Totais e Termotolerantes (NMP/ mL)	≤3	≤3	≤3
Bolores e Leveduras (UFC/mL)	2,43 log	1,78 log	≤1 log

1.5 DISCUSSÃO

A razão da escolha da abelha *Melipona bicolor* para a realização desta pesquisa está relacionada ao fato de essa ser uma espécie de abelha típica da região Sul do Brasil (NOGUEIRA-NETO, 1997), além de se tratar de uma espécie ameaçada de extinção (ÁVILA *et al*., 2018). O mel da Guaraipo possui sabor diferenciado, possuindo acidez mais elevada e maior teor de umidade se comparado ao mel de abelha europeia (BILUCA *et al*., 2017; FALEIROS-QUEVEDO & FRANCOY, 2022). Tais características impedem, entre outros fatores, que sejam aplicados os parâmetros estabelecidos para mel de *Apis mellifera* descritos na Instrução Normativa N°11 de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000).

Diante das análises dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos realizadas, constatou-se que os resultados obtidos encontram-se dentro dos padrões recomendados para mel de Abelhas sem Ferrão de acordo com as Legislações e Regulamentos Técnicos para Mel de Abelha sem Ferrão no Brasil (PARANÁ, 2017).

É importante considerar que as propriedades físico-químicas, composição química e atividades biológicas do mel dependem da espécie da abelha que o produziu, o estado fisiológico da colônia, a composição da flora utilizada, o nível de maturidade do mel, região geográfica, as condições climáticas no momento da colheita, estação do ano, entre outros fatores (ECHEVERRIGARAY *et al*., 2021; SOUSA *et al*., 2021; CHUTTONG *et al*., 2016). Neste trabalho, a colheita foi realizada durante o período de verão, com temperaturas variando entre 18 a 25°C ao longo do dia. No verão, há um aumento do nível de produção de mel pelas abelhas. A temperatura é um fator determinante para as abelhas desenvolverem suas atividades. Por se tratarem de seres ectotérmicos, há uma significativa troca de calor dos organismos das abelhas com o ambiente. Baixas temperaturas reduzem seu metabolismo, impedindo até mesmo seu voo. Enquanto temperaturas muito elevadas estimulam o comportamento de ventilação da colônia com o objetivo de reduzir a temperatura (CAMPOS *et al*., 2010; DE MOURA *et al*., 2022).

A determinação do teor de umidade do mel está diretamente relacionada à maturidade do produto e possibilidade de desenvolvimento de microrganismos indesejados (OLIVEIRA *et al*., 2023). De acordo com o RTIQ, o teor máximo de umidade estabelecido para mel refrigerado é de 35 g/100 g. Sendo assim, os resultados obtidos ($\bar{x}$=24,76g/100g) encontram-se alinhados aos requisitos recomendados pela legislação para mel de abelhas nativas sem ferrão vigentes (PARANÁ, 2017).

É importante ressaltar que o mel de abelha sem ferrão possui um maior teor de umidade em relação ao mel de *Apis mellifera*, cujo limite máximo permitido estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade encontra-se em 20 g/100 g (BRASIL, 2000). Isso ocorre em razão do processo de produção realizado por cada espécie de abelha pois, durante a produção do mel, as abelhas *Apis mellifera* batem as asas incessantemente próximas aos favos com o objetivo de desumidificar o mel, o que também contribui para que não ocorra fermentação do mel, evitando sua deterioração (EYER *et al*., 2016; MITCHELL, 2019). Já o mel de abelha sem ferrão possui um processo de produção diferente, sendo depositado em potes. Dessa forma, possui maior tendência a fermentação (BARBOSA *et al*., 2013; REINHARD-JESAJAS *et al*., 2023).

Além disso, a alta temperatura e umidade das regiões tropicais e subtropicais, composição do néctar utilizado e a época em que o mel foi coletado também influenciam no teor de umidade do mel das abelhas nativas (ÁVILA *et al*., 2018; BRASIL, 2000), como podemos observar nas pesquisas feitas por Ávila (2019), Nascimento (2015) e Borsato (2013).

Quanto aos açúcares redutores, são predominantemente determinados pela glicose e frutose, principais monossacarídeos presentes no mel. Tal característica é influenciada pela florada da região onde o meliponário se encontra e da época em que o mel foi coletado (ÁVILA *et al*., 2018, OLIVEIRA *et al*., 2023). A IN. nº11/2000 do MAPA estipula concentração mínima de 65% para açúcares redutores, no entanto, esse valor se aplica a méis de abelhas africanizadas (BRASIL, 2000). O RTIQ de mel de abelha sem ferrão no Paraná estabelece valor mínimo de açúcares redutores de 47% (PARANÁ, 2017). Sendo assim, os valores obtidos ($\bar{x}$ = 62,96%) seguem os requisitos mínimos estabelecidos pela legislação e estão próximos aos valores obtidos por outros autores (BORSATO, 2013, NASCIMENTO *et al*., 2015; BILUCA *et al*., 2016).

Cerca de 60% dos açúcares totais são constituídos por açúcares redutores. A quantidade de açúcares totais não possui um limite estabelecido no RTIQ para mel de abelha sem ferrão no Brasil. No entanto, Echeverrigaray *et al.* (2021) apresentaram resultados obtidos de análises da quantidade de açúcares totais em mel de *Melipona*, possuindo médias de 80,39%, valor significativamente diferente dos resultados obtidos no presente trabalho ($\bar{x}$=65,63%). No entanto, é importante ressaltar que, ainda que o mel seja produzido pela mesma espécie de abelha, existem inúmeros fatores que influenciam na composição do mel e suas características fisico-químicas, o que justifica a dificuldade em estabelecer padrões de identidade e qualidade que representem a realidade de modo geral (NORDIN *et al*., 2018). Nesse caso, é provável que a diferença esteja relacionada ao local de coleta, já que

Echeverrigaray *et al.* (2021) coletaram suas amostras em área composta por matas nativa e exótica, sendo que, no presente trabalho, as amostras de mel foram coletadas de regiões compostas por formações secundárias em estágio médio e avançado.

Sacarose aparente é definida como principal dissacarídeo presente no mel (DEMETERCO, 2016). De acordo com as recomendações das legislações e RTIQ, as concentrações devem possuir limite de 5% (PARANÁ, 2017). Alguns méis apresentam valores indetectáveis de sacarose aparente (BATISTON *et al*., 2020, BILUCA *et al*., 2016), no entanto, outros trabalhos indicaram a presença de sacarose aparente em níveis de acordo do limite recomendado (BORSATO, 2013, NASCIMENTO *et al*., 2015; ÁVILA *et al*., 2019). Concentrações acima dos limites indicam que a coleta foi realizada antes da maturação do mel, ou seja, a sacarose ainda não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase (JULIKA *et al*., 2020). Diante disso, é possível constatar que os resultados obtidos ($\bar{x}$=2,6%) encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação (PARANÁ, 2017).

Mel de abelhas sem ferrão possui caráter ácido, com baixo pH e alta acidez. Tais parâmetros estão diretamente relacionados à qualidade do produto, pois podem indicar sua deterioração (NORDIN *et al*., 2018). Valores de pH reduzidos inibem o crescimento microbiano, entretanto, valores de acidez maiores que 60 mEq kg^{-1}, que consiste no nível máximo de acidez livre permitido em mel (A.O.A.C., 1998), juntamente com baixos valores de pH, podem sugerir fermentação de açúcares em ácidos orgânicos, ocasionando a formação de ácido acético (BERGAMO *et. al*., 2019).

O RTIQ para mel de abelha sem ferrão no Paraná estabelece pH máximo de 4,7 (PARANÁ, 2017), sendo a média do pH de mel de *Melipona bicolor* no Brasil equivalente à 3,42. Com isso, podemos concluir que o pH do mel analisado nesse trabalho ($\bar{x}$=2,95) se adequa aos requisitos do RTIQ para mel de *Melipona bicolor* no Brasil e encontra-se próximo aos valores de pH de mel de *Melipona bicolor* identificados no Brasil (ÁVILA *et al*., 2019, BATISTON *et al*., 2020, BILUCA *et al*., 2016, BORSATO, 2013; BRASIL, 2023).

Outro parâmetro relacionado à deterioração do mel é a atividade de água, consistindo em uma medida que avalia a disponibilidade de água susceptível a reações químicas e enzimáticas. Quanto maior a atividade de água, maior a possibilidade de multiplicação dos microrganismos (ECHEVERRIGARAY *et al*., 2021). A atividade de água necessária para o desenvolvimento de microrganismos está abaixo de 0.98, sendo cerca de 0,7 para bolores, 0,8 para leveduras e 0,9 para bactérias (ÁVILA *et al*., 2018). O RTIQ de Mel de Abelhas Nativas Sem Ferrão não possui um parâmetro para atividade de água em mel de abelha sem ferrão no Paraná, no entanto, estabelece uma escala de 0,52 a 0,8 para méis coletados em São Paulo,

valores próximos aos resultados de atividade de água obtidos ($\bar{x}$=0,67) (PARANÁ, 2017; SÃO PAULO, 2017).

O hidroximetilfurfural (HMF) é uma molécula resultante das reações de decomposição ácida dos monossacarídeos presentes no mel (glicose e frutose) e da condensação de carboidratos com grupos amina livres, conhecida como reação de Maillard, uma reação de escurecimento não enzimática. O HMF pode ou não estar presente em mel fresco. A presença dessa molécula em quantidades mínimas pode ocorrer de forma natural, bem como seu gradativo aumento de acordo com o tempo. Portanto, o HMF é classificado como um parâmetro de frescor e qualidade do mel (GRAINGER *et al*., 2017, SHAPLA *et al*., 2018, NORDIN *et al*., 2018).

Além disso, a exposição do mel a temperaturas elevadas acarreta o aumento na formação de HMF, podendo ser causado pelo aquecimento inadequado realizado em méis cristalizados com o objetivo de facilitar o processo de beneficiamento em entrepostos ou por altas temperaturas ocasionadas pelo clima, incluindo exposição ao sol. Desse modo, o teor de HMF elevado indica aquecimento, armazenamento prolongado e processamento inadequado. Ademais, pode ser considerado um indicador de adulteração do mel, em virtude da adição de adoçantes como sacarose de beterraba ou cana, açúcar de milho, açúcar de arroz, frutose, xaropes de milho ricos em frutose, maltose e açúcar invertido (OROIAN *et al*., 2023; ROBERTSON, 2019; ÁVILA *et al*., 2018).

Os teores de HMF registrados no Paraná para méis de *Melipona bicolor* variam desde teores mínimos de 0,21 (ÁVILA *et al*., 2019) e 5,88 (BORSATO, 2013) até 31,58 (NASCIMENTO *et al*., 2015), sendo considerado o limite máximo como 40 mg/kg (PARANÁ, 2017). Não foram detectadas quantidades significativas de HMF no mel das três propriedades analisadas no presente estudo, indicando presença de HMF de acordo com os valores recomendados pelo RTIQ (PARANÁ, 2017). Sendo assim, constatou-se que não houve aquecimento do mel, bem como não ocorreram processamentos inadequados durante sua manipulação que elevassem o teor de HMF. Outra justificativa para os resultados obtidos pode estar atribuída ao tempo de armazenamento, visto que, do momento da colheita até o momento das análises, houve um curto período (6 meses), podendo ser considerado insuficiente para que ocorra acúmulo significativo de HMF no mel (NORDIN *et al*., 2018).

No que se refere aos parâmetros microbiológicos do mel de *M. bicolor*, os resultados da contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias apresentaram 3,29 log10 UFC/mL^{-1} para a localidade A, 2,46 log10 UFC/mL^{-1} para a localidade B e 4,08 log10 UFC/mL^{-1} para a localidade C. Não há a existência de parâmetros microbiológicos

recomendados para mel de abelha sem ferrão no Brasil. As diferenças nas características entre mel de *Meliponas* e *Apis mellifera* impedem a utilização dos parâmetros recomendados pela IN N°11 de 2000 (BRASIL, 2000).

Quanto aos resultados para coliformes totais e termotolerantes, foram encontrados ≤0,3/g NMP para todas as amostras. A Legislação Federal preconiza o limite de 10^2 para coliformes em mel de *M. bicolor* (PARANÁ, 2017). Sendo assim, os achados obtidos estão dentro dos parâmetros determinados pela Legislação e consolidam resultados anteriores (SILVA *et al.,* 2021; DELGADO *et al*., 2020; ÁVILA *et al*, 2019).

A presença de coliformes em mel indica contaminação, podendo ser adquirida por meio de uma fonte externa ao ninho, sendo levada pela abelha. A contaminação também pode ocorrer pela falta de adoção de Boas Práticas de Fabricação no momento da colheita do mel ou durante seu transporte, entre outros fatores (SILVA *et al*., 2021).

A Legislação do Estado do Paraná permite contagens de até 4,00 log UFC/mL^{-1} de bolores e leveduras (PARANÁ, 2017). Os resultados obtidos na contagem de bolores e leveduras foram 2,43 log UFC/mL^{-1} para as amostras da localidade A e 1,78 log UFC/mL^{-1} para a localidade B, sendo ausentes nas amostras coletadas da localidade C. Portanto, estão alinhados aos requisitos estabelecidos pela Legislação Estadual para mel de abelhas nativas sem ferrão.

A presença de bolores e leveduras pode estar relacionada ao processo de produção do mel, visto que a presença de leveduras, juntamente com a umidade elevada, favorecem a fermentação espontânea após o processo de cristalização, pois a separação de fases ocasiona aumento da atividade de água, criando um ambiente favorável para a fermentação do mel e consequente multiplicação de leveduras (SILVA *et al*., 2022; CHIRIFE *et al*., 2006). No entanto, é importante ressaltar que algumas leveduras estão relacionadas ao desenvolvimento e nutrição das abelhas (ECHEVERIGARAY, 2021).

As amostras A e B apresentaram contagem de 2,43 e 1,78 UFC/mL, respectivamente. A ausência de bolores e leveduras observada na amostra C pode estar correlacionada ao fato de esta amostra ser a única que não apresentou cristalização, além de apresentar um teor reduzido de sacarose aparente com relação às demais amostras. Foi observada a presença de bolores e leveduras em pesquisas anteriores (ECHEVERRIGARAY *et al*., 2021; SILVA *et al*., 2021; da SILVA *et al*., 2022; DE SOUSA *et al*., 2022). Todavia, sua ausência também foi relatada previamente (SILVA *et al*., 2016).

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Parâmetros físico-químicos e microbiológicos são fundamentais para constatar a qualidade e inocuidade de um produto, possibilitando que este seja comercializado de acordo com as normas exigidas pela legislação, assegurando a saúde do consumidor. O teor de umidade, açúcares, pH e HMF obtidos no presente estudo indicam que o mel de *Melipona bicolor* coletado em três propriedades distintas localizadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR está alinhado aos requisitos mínimos existentes nas Legislações e Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade para Meliponicultura no Paraná, logo, é adequado para consumo e apto para comercialização. No entanto, a inexistência de critérios para atividade de água e contagem padrão de bactérias mesófilas ressaltam a importância da determinação de parâmetros que representem a realidade dos méis de abelhas sem ferrão, tanto para auxiliar o produtor a comercializar o produto quanto à prevenção de fraudes. Além disso, as distinções existentes entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos do mel de abelhas nativas de diferentes regiões, ainda que seja produzido pela mesma espécie, dificultam a elaboração de uma legislação que se aplique de forma geral a todo o território brasileiro. Sendo assim, é necessário que cada Estado estabeleça seus parâmetros, possuindo escalas que possibilitem o cumprimento das normas exigidas, independentemente da espécie de abelha utilizada, ou ainda, classificar os parâmetros de acordo com os respectivos gêneros.

REFERÊNCIAS

ALONSO, W. J., Lucena, T., Fracasso, C.M., Velthuis, H.H.W., Imperatriz-Fonseca, V.L. Do *Melipona bicolor* (Apidae, Meliponinae) workers distinguish relatedness among different physogastric queens? **Apidologie** 29:503–512, 1998.

Association Of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th. v. II., 2000.

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.

ÁVILA, S., HORNUNG, P.S., TEIXEIRA, G.L., MALUNGA, L.N., APEA-BAH, F.B., BEUX, M.R., BETA, T., RIBANI, R.H. Bioactive compounds and biological properties of Brazillian stingless bee honey have a Strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International**, v. 123, p. 1–10, 2019.

BARBOSA, F.M., Alves, R.M., Souza, B. De A., Carvalho, C. A. L. Nest architecture of the stingless bee *Geotrigona subterranea* (Friese,1901) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Biota Neotropica**, v. 13, n. 1, 2013.

BATISTON, T.F.T.P., Frigo, A., STEFANI, L.M., DA SILVA, A.S., Araujo, D.N. Physicochemical composition and antimicrobial potential of stingless honey: a food of differentiated quality. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020.

BERGAMO, G., Seraglio, S. K. T., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. C. O. Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. **Food Research International**, vol.116, pág. 745–754, 2019.

BILUCA, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae**). Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61–69, 2016.

BILUCA, F. C., de Gois, J. S., Schulz, M., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Maltez, H. F., Fett, R. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89–97, 2017.

BRAGHINI, F., Biluca, F.C., Schulz, M., Gonzaga, L., Costa, A.C.O., Fett, R. "Stingless Bee Honey: A Precious but Unregulated Product - Reality and Expectations**." Food reviews international** 38.S, pág. 683–712, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Características Físico-Químicas dos principais Produtos Meliponícolas e Legislações e Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQs) na Meliponicultura.** 1ª Edição. Brasília-DF, 2023

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. **Legislação de Produtos Apícolas e Derivados**. Instrução Normativa

n. 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel.

BORSATO, D.M. **Composição química, caracterização polínica e avaliação de atividades biológicas de méis produzidos por meliponíneos do Paraná (Brasil)**. 2017. 153 p. Tese (doutorado)- Universidade Federal do Paraná-UFPR. Curitiba, 2013.

CAMPOS, F.S., GOIS, G.C. e CARNEIRO, G.G. Termorregulação colonial em abelhas sem ferrão. PUBVET, Londrina, v. 4, n. 24, Ed. 129, Art. 872, 2010.

CELLA, I., Amandio, D. T. T., Faita , M. R. **Meliponicultura: Boletim Didático**, 141. 1. ed. Florianópolis, SC: Epagri, 2017. 56p.

CHIRIFE, J., Zamora, M.C., Motto, A. The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. **Journal of Food Engineering**, v. 72, p. 287–292, 2006.

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, pág. 441–451, 2016.

DA SILVA, T. M. F. S. S., Ávila, S., Matos, M. G., Junkert, A. M., Frizon, C. N. T., Pontarolo, R., Beux, M. R., & Ferreira, S. M. R. Effect of preservation methods on antimicrobial activity, and nutritional and microbiological quality of *Melipona quadrifasciata* bee honey. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.46, n.10, e16917, 2022.

DE SOUSA, B. F. S., Santos, G. G., Mesquita, J. A., Nascimento, C. A. J., Freire, G. C., Santos, V. T. F., Carvalho, G. A. C., & Barros, J. R. S. Physicochemical composition and microbiological quality of honey produced from Tiúba, *Melipona fasciculata* (Apidae, Meliponini) in Brazil. **Journal of Apicultural Research**, pág. 1-9, 2022.

DE MOURA, M. E. K., Faita, M. R., Amandio, D. T. T., Garcia Bertoldo, J., Pereira Lima, V., & Poltronieri, A. S. Influence of some abiotic factors on the flight activity of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) in Southern Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v. 63, n.4, p. 603–609, 2022.

DELGADO, C., Mejía, K., Rasmussen, C. Management practices and honey characteristics of *Melipona eburnea* in the Peruvian Amazon. **Ciência Rural**, v.50 n.12, e20190697, 2020.

DEMETERCO, C.A. **Identificação de mel de *Melipona seminigra* e características da meliponicultora em Maraã e Boa Vista do Ramos, Amazonas**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. Manaus-AM. 81 p., 2016.

ECHEVERRIGARAY, F.J.S., Foresti, L., Schwarz, L.V., Rocha, R.K.M., da Silva, G.P., Moreira, J.P., Delamare, A.P.L. Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology,** 347, 2021.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Brasil em 50 alimentos** / Embrapa. – Brasília, DF: Embrapa, 2023. 359 p.

ENGEL, M. S., R. Claus, Ayala, R., de Oliveira, F. F. Stingless bee classification and biology (Hymenoptera, Apidae): a review, with an update key to genera and subgenera. **Zookeys**, vol.1172, pág. 239–312, 2023.

EYER, M, Neumann P, Dietemann V. A Look into the Cell: Honey Storage in Honey Bees, *Apis mellifera*. **PLoS One**., v. 11, n.8, e0161059, 2016.

FALEIROS-QUEVEDO, M.; FRANCOY, T. M. Stingless bees honeys: physical-chemical characterization, difficulties and challenges. **Research, Society and Development**, *[S. l.]*, v. 11, n. 6, p. e25411628996, 2022.

GRAINGER, M.N.C., Owens, A., Manley-Harris, M., Lane, J.R., Field, R.J. Kinetics of conversion of dihydroxyacetone to methylglyoxal in New Zealand mānuka honey: Part IV – Formation of HMF. **Food Chemistry**, v. 232, Pages 648–655, 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, I. A. L. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV Edição, 1° Edição digital, 2008.

ISO 4833-1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 ºC by the pour plate technique. **The International Organization for Standardization**, ed. 1, 2013.

ISO 4833-2. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30 ºC by the surface plate technique**. The International Organization for Standardization**, ed. 1, 2013, Corrigendum 1, 2014.

JEURING, H. J., & KUPPERS, F. J. High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey**. Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 63(6), 1215–1218, 1980.

JULIKA, W.N., Ajit, A., Ismail, N., Aqilah, N., Naila, A., Sulaiman, A.Z. Sugar profile and enzymatic analysis of stingless bee honey collected from local market in Malaysia**. IOP Conference Series: Material Science and Engineering**, pág. 736 062001, 2020.

LANE, J.H. & Eynon, L. Methods for Determination of Reducing and Non-Reducing Sugars. **Journal of Sciences**, 42, 32-37, 1923.

MICHENER, C. D**. Bees of the world**. In American Scientist, 2 ed, v. 78, n. 2, 972 p. The Johns Hopkins University Press., 2007.

MITCHELL, D. Nectar, humidity, honey bees (*Apis mellifera*) and varroa in summer: a theoretical thermofluid analysis of the fate of water vapour from honey ripening and its implications on the control of Varroa destructor. **Journal The Royal Society Publishing Interface**, v.16, n.156, 20190048, 2019.

NASCIMENTO, A.S.; Marchini, L.C.; Carvalho, C.A.L.; Araujo, D.F.D.; Olinda, R.A.; Silveira, T.A. Physical-chemical parameters of honey of stingless bee (Hymenoptera: Apidae). **American Chemical Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 139 – 149, 2015.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora

Nogueirapis, 1997. 446 p.

NORDIN, A., Sainik, N. Q. A. V., Chowdhury, S. R., Saim, A. Bin, & Idrus, R. 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.

OLIVEIRA, E. V. S., Vasconcelos, G. K. C., da Silva, J. B., da Silva, E. V. C. Caracterização Físico-Química dos Méis e Pólens da Abelhas sem Ferrão das Espécies *Melipona flavolineata* e *Melipona fasciculata.* **Química Nova** vol. 46 n.10, pág. 942–948, 2023.

OROIAN M., Dranca F., Ropciuc S., Pauliuc D.A comparative study regarding the adulteration detection of honey: Physicochemical parameters vs. impedimetric data. **Current Research in Food Science**, v. 7, 2023.

PIMENTEL, T. C., Rosset, M., de Sousa, J. M. B., de Oliveira, L. I. G., Mafaldo, I. M., Pintado, M. M. E., Souza, E. V., & Magnani, M. Stingless bee honey: An overview of health benefits and main market challenges. **Journal of Food Biochemistry**, 46(3), e13883, 2021.

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. (eds). Fungi and Food Spoilage. **Springer**, 3 ed., 2009.

RYSER, E.T. & Schuman, J.D. Mesophilic Aerobic Plate Count. In: SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M.L. (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, American Public Health Association, Washington, D. C., v. 8, ed.5, p.95-101, 2015.

RICE, E.W., BAIRD, R.B., EATON, A.D. & CLESCERI, L.S. (Eds). **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater**, ed.22. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF), 2012.

ROBERTSON, K. HMF: The effects of aging and heat treatment of honey. **New Zeland Beekeper Journal**, vol. 27 n.8, p. 8–11, 2019.

REINHARD-JESAJAS, D., Atmowidi, T., Juliandi, B., Kahono, S. The characteristics of stingless bee nests (Apidae: Meliponini) in the Cycloop Mountain Nature Reserve, Indonesia. **Revista de Biologia Tropical**, v.71, n.1, 2023.

SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M.L. (eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, Ed. 5 Washington: American Public Health Association (APHA), 2015.

SÃO PAULO. Resolução SAA n° 52 de 3 de outubro de 2017. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha Social Sem Ferrão**. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Governo de São Paulo.

SHAPLA, U.M., Solayman M., Alam N., Khalil M.I., Gan S.H. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. **Chemistry Central Journal**, vol. 12, p. 1–18, 2018.

SILVA, K. D. N., Barbosa, R. N., Oliveira, P. A., Cavalcante, M. C., & Melo, H. F. Inhibition of pathogens by sporogenic bacteria isolated from honey of *Melipona* sp. (Apidae: Apinae: Meliponini). **Revista Caatinga**, 29, 1021-1027., 2016.

SILVA, I. P., Caldas, M. J. M., Machado, C. S., Nascimento, A. S., Lordêlo, M. S., Bárbara, M. F. S., Evangelista-Barreto, N. S., Estevinho, L. M., & Carvalho, C. A. L. Antioxidants activity and physicochemical properties of honey from social bees of the Brazilian semiarid region. **Journal of Apicultural Research**, 60(5), 797-806, 2021.

SILVA, J.B., Nunes, A.T., Cruz, T.M.S., dos Prazeres, A.R. Evaluation of physic contaminants and contamination with coliforms, molds and yeasts of honey from the Northern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.28, n.2, p. 117-123, 2021.

SILVA, T. M. F. S. S., Ávila, S., Matos, M. G., Junkert, A. M., Frizon, C. N. T., Pontarolo, R., Beux, M. R., Ferreira, S. M. R. Effect of preservation methods on antimicrobial activity, and nutritional and microbiological quality of *Melipona quadrifasciata* bee honey. **Journal of Food Processing and Preservation**, 00: e16917, 2022.

SOUSA, E.C., Menezes, C., Flach, A. Stingless Bee Honey: Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a review of quality control, chemical profile, and biological potential. **Apidologie**, v. 52, pág. 113–132, 2021.

SPINK, J., Bedard, B., Keogh J., Moyer, D. C., Scimeca, J., Vasan, A. International Survey of Food Fraud and Related Terminology: Preliminary Results and Discussion. **Journal of Food Science**, v.84, n. 10, 2019.

VILLAS BÔAS, J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão**. 1. ed. Brasília, DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). 2012.

WEHR, H.M. & FRANK, J.F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, ed. 17 American Public Health Association, Washington, D. C., 2004.

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE *Melipona bicolor*

2.1 RESUMO

O mel de abelhas sem ferrão possui composição química diferenciada, com a presença de nutrientes e compostos bioativos que podem conferir propriedades terapêuticas, incluindo atividade antimicrobiana. Por outro lado, cepas bacterianas ameaçam a cadeia de produção de alimentos devido à sua capacidade em adquirir genes de resistência e se disseminar com facilidade, tornando seu controle um desafio considerável à indústria alimentícia mundial. Com isso, é emergente a busca pelo desenvolvimento de métodos alternativos para o controle microbiano. Diversos estudos vêm sendo realizados comprovando o efeito antimicrobiano do mel de abelha sem ferrão, no entanto são escassos os estudos relativos à potencial ação antimicrobiana do mel de *Melipona bicolor*. Portanto, objetivo desta pesquisa foi investigar a atividade antimicrobiana do produto frente a isolados bacterianos de *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*. Para isso foi coletado mel da abelha *Melipona bicolor* em três meliponários distintos localizados na Região Metropolitana de Curitiba-PR e testados frente à *S*. Heidelberg, *S*. Typhimurium e *S. aureus* selvagem pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e frente à *S*. Heidelberg e *S*. Typhimurium pelo método de *Time Kill Assay* (TKA) para avaliação do seu potencial antimicrobiano. Foi constatada ação bacteriostática do produto contra *S*. Heidelberg e *S*. Typhimurium por meio da CIM na concentração de 1%. Por meio do TKA verificou-se que a ação antimicrobiana ocorreu no Tempo Zero com a concentração de 0,5% contra *S*. Heidelberg. Sendo assim, foi constatada potencial ação antimicrobiana do mel de *M. bicolor* frente à cepas de *S.* Heidelberg.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão; Concentração inibitória Mínima; *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*; Segurança de Alimentos; Análise de Alimentos; Composição de Alimentos.

2.2 INTRODUÇÃO

O mel de abelhas sem ferrão possui características singulares e propriedades diferenciadas que podem ser determinadas de acordo com a espécie de abelha, a composição botânica e condições edafoclimáticas do local onde o meliponário se encontra (NORDIN *et al*., 2018; EMBRAPA 2023). As particularidades do mel de abelhas nativas o tornam um objeto de estudo de grande interesse entre os pesquisadores, que têm constatado inúmeros benefícios para a saúde humana e animal, além dos benefícios nutricionais, possuindo composição química diferenciada, com a presença de carboidratos, aminoácidos, vitaminas, minerais e compostos bioativos, que podem conferir propriedades terapêuticas, como atividade antioxidante e antimicrobiana (BILUCA *et al*., 2017; ÁVILA *et al*., 2018; KHONGKWANMUEANG *et al*., 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é identificada como uma das ameaças globais mais graves à saúde pública atualmente (WHO, 2023; AIJAZ *et al*., 2023). O uso constante e indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e animal é o principal fator responsável por gerar essa resistência, levando a incapacidade dos antimicrobianos de combater microrganismos, sendo prevista a perda total de sua eficácia até o ano de 2050 (MWANGI *et al*., 2024). Diante disso, se faz nececessária a busca por novos compostos, capazes de controlar a propagação de microrganismos resistentes, especialmente aqueles associados a quadros infecciosos em seres humanos e animais (ARDAKANI *et al*., 2023; PULINGAM *et al*., 2022).

Dentre as bactérias relacionadas à essas doenças, a *Salmonella* enterica se destaca como um dos principais agentes patogênicos, sendo capaz de causar salmonelose em humanos, podendo levar a sintomas como diarreia, dores abdominais, febre, náusea, vômitos e, em alguns casos, pode levar a óbito (SODAGARI *et al*., 2020; CHLEBICZ & ŚLIŻEWSKA, 2018). Casos de doenças veiculadas por alimentos associados a infecções por *Salmonella* são frequentemente relacionados a óbitos em países desenvolvidos (WHO, 2020).

Um dos sorovares do gênero *Salmonella* que possui importância em saúde pública é a *Salmonella* Heidelberg, sendo constantemente isolada em frangos de corte, podendo apresentar multiresistência a antimicrobianos (SOARES *et al*., 2023). A *S.* Heidelberg está continuamente associada a infecções humanas veiculadas por alimentos e possui manifestação clínica mais grave que outros sorotipos. Além da capacidade de formação de biofilme, este sorovar é capaz de alterar sua própria morfologia para se adaptar e desenvolver resistência a antimicrobianos (CLOTHIER & BYRNE, 2016; OBE *et al*., 2018;

CARRASCOSA *et al*., 2021).

Outro sorovar que possui destaque no âmbito da saúde pública é a *S*. Typhimurium, um dos principais sorovares associados à contaminação em carnes de aves, contaminação em ovos e surtos de doenças transmitidas por alimentos em humanos. Possuindo capacidade de se multiplicar em células fagocíticas, este sorovar tem se tornado objeto de preocupação devido a sua habilidade em desenvolver resistência a agentes antimicrobianos (APOORVA *et al*., 2020; HOFACRE *et al*., 2021).

Também é importante destacar a *Staphylococcus aureus,* outro microrganismo frequentemente associado a quadros infecciosos, responsável por uma alta taxa de morbidade e mortalidade mundialmente (HOWDEN *et al*., 2023). Além de ser amplamente conhecida como uma espécie de bactéria comensal, patogênica e oportunista para humanos e animais, sendo frequentemente encontrada associada a diversas formas de infecções bacterianas de gravidade altamente variável, a *S. aureus* apresenta alta taxa de resistência aos antimicrobianos convencionais, sendo uma insigne motivação para a busca por novas alternativas de tratamento de infecções (CUNY *et al*., 2024, ARDAKANI *et al*., 2023).

Perante o exposto, enfatiza-se o crescente interesse em gerar tratamentos antimicrobianos a base de produtos naturais (SHAMSUDIN *et al*., 2022). Nesse contexto, o mel de abelhas nativas de diversas espécies vem apresentando atividade antimicrobiana, devido à presença de substâncias capazes de inibir o crescimento de microrganismos. Tal propriedade torna o mel de abelha sem ferrão um agente potencial no combate a infecções e no suporte ao sistema imunológico (PIMENTEL *et al*., 2013; SOUSA *et al*., 2016; ÁVILA *et al*., 2018; TUKSITHA *et al*., 2018; KHONGKWANMUEANG *et al*., 2020).

O potencial antimicrobiano pode ser atribuído a muitos fatores, como a composição do solo local, os fitoconstituintes presentes nas plantas utilizadas pelas abelhas para produzir o mel e as condições atmosféricas da região, além de ser influenciado por fatores físicos, como acidez e osmolaridade, bem como os fatores químicos, relacionados à presença de flavonoides e ácidos fenólicos (SOUSA *et al*., 2016;). Os processos metabólicos envolvidos na fermentação e maturação do mel também podem ser a justificativa para esses benefícios. No entanto, é necessário ampliar o conhecimento acerca desses processos, correlacionando com a espécie da abelha e a caracterização botânica e geográfica do local onde o meliponário se encontra (BILUCA *et al*., 2016).

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão, a *Melipona bicolor* é conhecida pela sua importância na polinização de plantas, produção de mel e preservação da biodiversidade. Típica da região Sul do Brasil (NOGUEIRA-NETO, 1997), *M. bicolor* é classificada como

uma espécie ameaçada de extinção (ICMBio, 2018). Popularmente chamada de Guaraipo, essa espécie de abelha produz mel com características únicas, possuindo sabor levemente ácido e textura mais fluida, além de possuir hábitos pouco comuns, como a poliginia, que consiste na presença de mais de uma abelha no ninho, e a construção de ninhos próximos à superfície do solo (FALEIROS-QUEVEDO & FRANCOY, 2022; VELTHUIS *et al*., 2006).

Cientistas já observaram o potencial antimicrobiano do mel de abelhas do gênero *Melipona (*RAMÓN-SIERRA *et al*., 2022; SILVA et al., 2022; DOMINGOS *et al*, 2021; SILVA *et al*., 2016; PIMENTEL *et al*., 2013; DA SILVA *et al*., 2013). No entanto, não há estudos que tratem do potencial antimicrobiano do mel de *Melipona bicolor* disponíveis na literatura. Com isso, o objetivo nesse trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana do mel da abelha *Melipona bicolor* coletado em três propriedades distintas localizadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR, testando-o frente à cepas de isolados bacterianos de *Salmonella* Heidelberg*, Salmonella* Typhimurium, e *Staphylococcus aureus* pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e frente à *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium pelo método *Time Kill Assay* (TKA).

2.2.1 OBJETIVOS

2.2.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano do mel de *Melipona bicolor* frente à cepas de salmonela e estafilococos.

2.2.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar a ação antimicrobiana dos méis de *Melipona bicolor* de três localidades distintas situadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR frente a cepas de isolados bacterianos de *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus* por meio da Concentração Inibitória Mínima;
- Testar a Concentração Bactericida Mínima dos méis de *Melipona bicolor* de três localidades distintas situadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR frente a cepas de isolados bacterianos de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium a partir da Concentração Inibitória Mínima obtida;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos méis de *Melipona bicolor* de três localidades distintas situadas na Região Metropolitana de Curitiba-PR frente a cepas de isolados bacterianos de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Typhimurium utilizando o método *Time Kill Assay*;
- Verificar a possibilidade de desenvolver compostos antimicrobianos a partir do mel de *Melipona bicolor*;

2.3 METODOLOGIA

2.2.1 Obtenção e Processamento das amostras

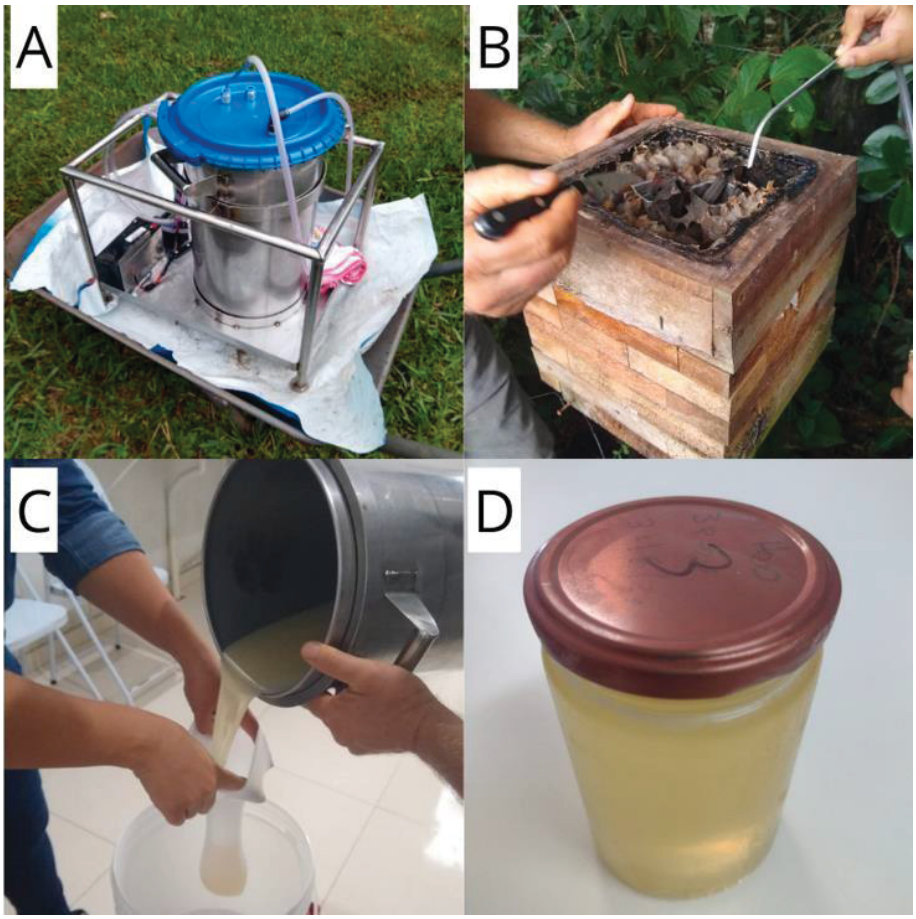
Foi realizada a colheita de mel da abelha *Melipona bicolor* (Cadastro SisGen A0818FE) na Região Metropolitana de Curitiba-PR, em três meliponários distintos localizados em propriedades privadas, em 23 de fevereiro de 2023. A primeira colheita foi realizada em uma propriedade localizada em Mandirituba, totalizando 2,053 kg de mel. A segunda colheita foi realizada em local situado em Fazenda Rio Grande, totalizando 2,312 kg. No terceiro local de colheita, também localizado em Mandirituba, foram obtidos 2,283 kg de mel (TABELA 2.1). As matas dos três locais de colheita são caracterizadas como formações secundárias em estágio médio e avançado. Os méis foram coletados de, em média, 4 a 6 caixas de cada propriedade. Não houve alimentação prévia das abelhas por se tratar de um período no fim do verão, visto que, no verão, há um aumento do nível de produção de mel pelas abelhas.

Todas as colheitas foram realizadas por meio de sucção, utilizando uma máquina sugadora de mel que consiste em um pequeno tanque com uma mangueira que funciona a base de pressão (FIGURA 2.1 A), desenvolvida pelos produtores Benedito Perin Uczai e Salete Perin Uczai. Primeiramente, realizou-se a limpeza externa das caixas, seguida pela retirada da tampa e lona, e posteriormente pela perfuração dos potes com o auxílio de uma faca. Após a perfuração, o cano da mangueira era posicionado no interior dos potes, realizando a sucção do mel (FIGURA 2.1 B). Após a colheita, foi realizada a filtração dos méis, utilizando tecido fio 40 (92% Poliamida, 8% Elastano) (FIGURA 2.1 C), seguida pelo envase desses méis em recipientes de vidro previamente esterilizados, que foram transportados sob refrigeração até o laboratório e armazenados no refrigerador a 4ºC até o momento das análises (FIGURA 2.1 D). O tempo máximo de armazenamento foi de 14 meses, sendo as análises realizadas dentro desse período. As amostras foram identificadas de acordo com o local de coleta (A, B, C).

TABELA 2.1 – Identificação e locais de colheita das amostras de mel.

Identificação	Cidade de colheita	Coordenadas
A	Mandirituba	-25.874460, -49.404861
B	Fazenda Rio Grande	-25.724054, -49.300099
C	Mandirituba	-25.803695, -49.303595

FIGURA 2.1- Máquina Sugadora De Mel (A); Processo de colheita do Mel (B); Filtração (C); Envase em recipiente de vidro previamente esterilizado (D).



Fonte: Os Autores (2024)

2.3.2 Cepas microbianas

Para realizar a recuperação da bactéria, retirou-se a cepa selvagem em temperatura ambiente do estoque de Ágar nutriente (Neogen, Michigan) pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos da UFPR, e inoculou-se em caldo infusão cérebro coração- BHI (HiMedia, India), armazenando na estufa a 35°C. Após 24 horas, realizou-se semeadura por esgotamento dos inóculos de *S*. Heidelberg e *S*. Typhimurium em placas de SS (Titan Biotech, India), Ágar Verde Brilhante (Kasvi, Itália) e *Salmonella* Cromogênica (Laborclin, Pinhais), que permaneceram na estufa a 35°C por 24 horas. Para realizar o isolamento das colônias de *S. aureus*, realizou-se a semeadura por esgotamento em placas de ágar Baird-Parker (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) enriquecido com Telurito gema de ovo (NewProv, Pinhais, Brasil), permitindo outro período dentro da incubadora por 24 horas a 35°C. Em seguida, retirou-se colônias das placas que foram

adicionadas em tubos contendo 9 mL solução salina peptonada, ajustando o inóculo a 10^8 Mc Farland (aproximadamente 6 log UFC/mL).

2.3.3 Concentração Inibitória Mínima

A partir das colônias isoladas, elaborou-se o inóculo com concentração padrão de unidades formadoras de colônia (CFU) seguindo uma modificação do método descrito por Tuksitha *et al*. (2018), selecionando entre 5 a 25 colônias e transferindo-as para tubos de ensaio de 9 mL de solução salina peptonada 0,1% como receptores das colônias isoladas e agitando em vórtex até que fosse obtida visualmente a concentração de 0,5 McFarland (1,5 X 10^8 UFC/mL), comparando o tubo de ensaio do inóculo com um tubo de sulfato de bário de turbidez padrão McFarland.

Uma amostra de mel de cada localidade foi selecionada. As diluições de mel testadas foram elaboradas em concentrações de 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% e 5% a partir da esterilização por filtragem com filtro para seringa membrana PES 0,22µm 30mm e diluição da alíquota filtrada em tubos de 10 mL de caldo Muller Hinton - MHB (HiMedia, Mumbai, Índia), sendo pipetados 5 µl, 10µL, 20 µL, 30 µL, 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL, 250 µL e 500 µL de mel filtrado em cada um dos tubos.

Foram dispensados 50 µL de cada uma das concentrações de mel em uma microplaca de 96 poços (placa de ELISA de fundo chato), da primeira à 10ª coluna das três fileiras. Subsequentemente, 50 µL de suspensão bacteriana (contendo aproximadamente 6 log UFC/mL) foram adicionados a cada poço. Nas duas útimas colunas da primera fileira, foram adicionados controles negativo (100 µL de Caldo Mueller Hinton) e positivo (50 ul de inóculo ajustado na escala de 6log UFC/ml em e 50 ul de Caldo Mueller Hinton). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. A avaliação foi feita por leitura visual, utilizando como revelador o Cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio PA ACS (TTC) (Inlab, São Paulo). Os testes foram realizados em triplicata, sendo utilizada uma placa para cada um dos três méis com cada uma das bactérias (SOUSA *et al*., 2016; TUKSITHA *et al*., 2018).

2.3.4 Concentração Bactericida Mínima

Após a leitura das placas de 96 poços, o último poço positivo, ou seja, a concentração inibitória mínima obtida para as 3 amostras, os dois poços anteriores e os dois poços após a Cconcentração Inibitória Mínima foram transferidos para placas com ágar específico para

Salmonella, como SS (Titan Biotech, India), Ágar Verde Brilhante (Kasvi, Itália) e *Salmonella* Cromogênica (Laborclin, Pinhais). As concentrações em que não houve crescimento foram consideradas bactericidas.

2.3.5 Time Kill Assay

Para avaliar o tempo de morte do inóculo frente ao agente antimicrobiano, primeiramente realizou-se o repique da cepa a ser utilizada. Após o plaqueamento em placa de Salmonella-Shigella (SS) (Titan Biotech, India), foram transferidas entre 5 e 30 colônias para um tubo contendo 5 mL de Caldo Mueller Hinton (HiMedia, India) para obter uma suspensão equivalente ao padrão de turbidez de 0,5 McFarland. Em seguida, transferiu-se 0,1 mL para outro tubo contendo 5mL de Caldo Mueller Hinton, agitando no vórtex e incubando em uma incubadora *shaker* refrigerada de agitação orbital (Toth) por 4 a 6 horas a 35°C até atingir a turbidez desejada, correspondendo à fase mid-log do inóculo.

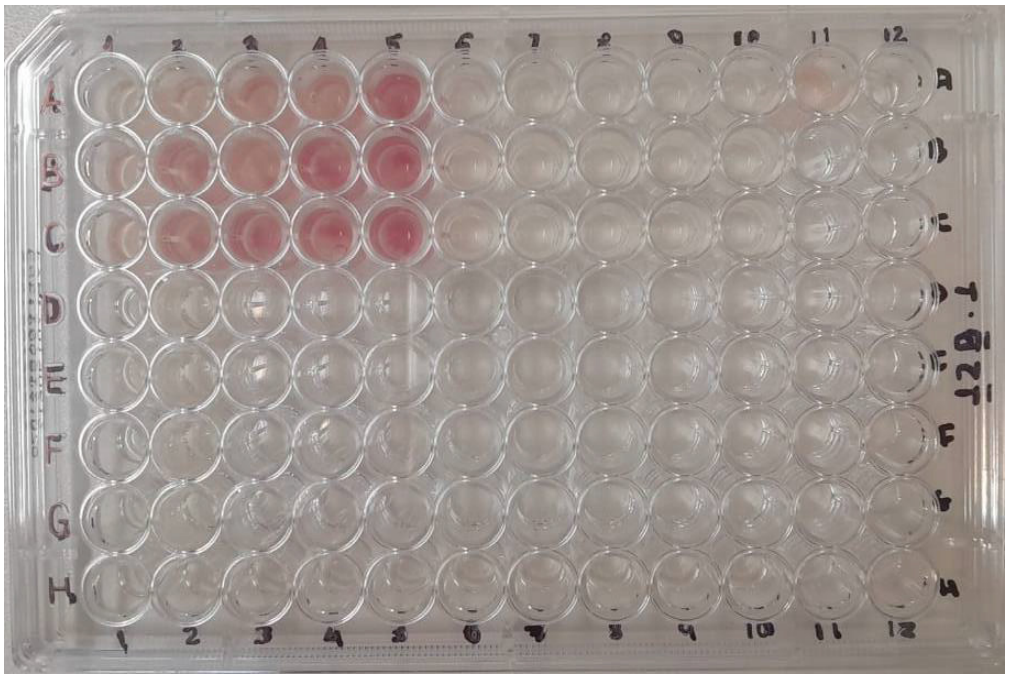
As doses correspondentes a ½ MIC, MIC e 2x MIC foram pipetadas em tubos com 10 mL de Caldo Mueller Hinton, sendo 50 µL, 100 µL e 200 µL, respectivamente. Foi selecionado o mel da propriedade C, por apresentar melhores condições de manuseio, pois dentre todas as amostras, não apresentou cristalização até o momento das análises. Após a retirada do tubo contendo o inóculo do *shaker*, foram pipetados 100 µL do inóculo nos tubos com as diferentes concentrações, incluindo o controle, que continha apenas 10 mL de Caldo MH. A partir dos tubos primários, foram realizadas diluições em série, atingindo a diluição de 10^{-8}, transferindo 100 µL de cada diluição para placas de SS nos tempos 0, 2, 4 e 6, em duplicata. Todas as placas foram incubadas em estufa a 35º por 24 horas. Para o controle de qualidade, foram preparados tubos com 10 mL de Caldo Mueller Hinton para controle de crescimento e controle de esterilidade.

Para realizar a leitura e interpretação dos resultados, realizou-se a contagem das placas com todas as diluições realizadas a partir dos tubos primários, considerando efeito bactericida como sendo redução maior ou igual a 3 log10 UFC (redução de 99,99%).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo método de Concentração Inibitória Mínima foi possível constatar ação antimicrobiana do mel de *Melipona bicolor* das amostras A, B e C contra os inóculos de *S.* Heidelberg e *S.* Typhimurium (FIGURA 2.2). O revelador utilizado no experimento (TTC) apresentou coloração avermelhada nas concentrações 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,5%, não apresentando mudança de cor a partir da concentração de 1% v/v (100 μL) para as amostras das três propriedades testadas frente à *S.* Heidelberg e *S.* Typhymurium.

FIGURA 2.2- CIM do Mel de *M. bicolor* frente a *S.* Heidelberg e *S.* Typhimurium.



Fonte: Os autores (2024)

O mecanismo de ação do TTC consiste em uma reação de redução. Sua forma é oxidada e incolor, porém, na presença de desidrogenases, é reduzido em formazan, manifestando coloração avermelhada (MIRANDA *et al*., 2023). A desidrogenase é uma enzima liberada diante de reações metabólicas que ocorrem nas células vivas, sendo assim, sua presença indica a multiplicação de microrganismos (QYN *et al*., 2022; AONOFRIESEI & LUPSOR, 2013).

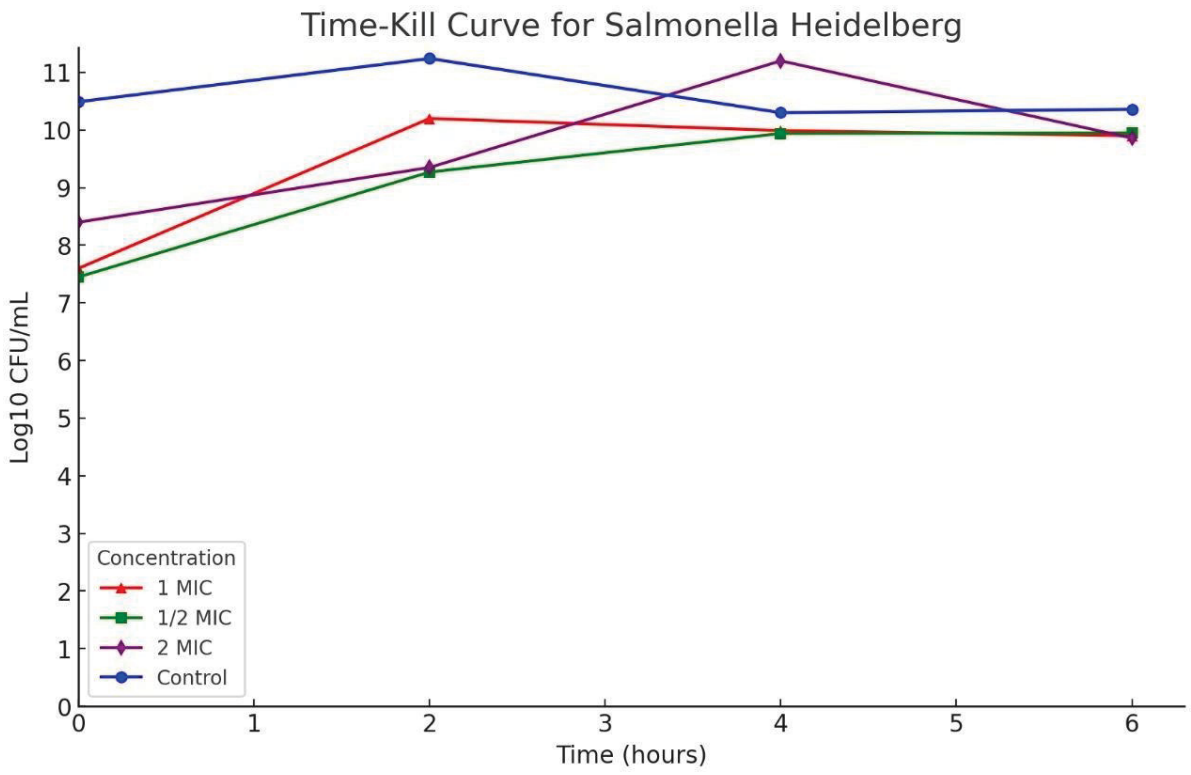
Não foi constatada ação antimicrobiana frente à *S. aureus*. O perfil multiresistente apresentado por este microrganismo pode ser a razão da ausência de susceptibilidade (ARDAKANI *et al*., 2023). Os resultados obtidos confrontam os achados de Domingos *et al.* (2021), que observaram efeito antimicrobiano mais eficaz do mel de *Melipona* spp. contra

bactérias Gram-positivas em comparação com seus efeitos contra bactérias Gram-negativas. Por não obter uma Concentração Inibitória Mínima, não foi possível prosseguir com as análises de Concentração Bactericida Mínima e *Time Kill Assay* para *S. aureus*.

Quanto aos resultados de Concentração Bactericida Mínima, o crescimento microbiano se mostrou presente nas análises dos méis das três propriedades contra os inóculos de *S.* Heidelberg e *S.* Typhimurium, indicando que não houve efeito bactericida do mel sobre as bactérias analisadas neste trabalho. No entanto, valores de CBM podem ser mais altos do que CIMs dependendo do mel e bactéria testados (DOMINGOS *et al*., 2021; KHONGKWANMUEANG *et al*., 2020).

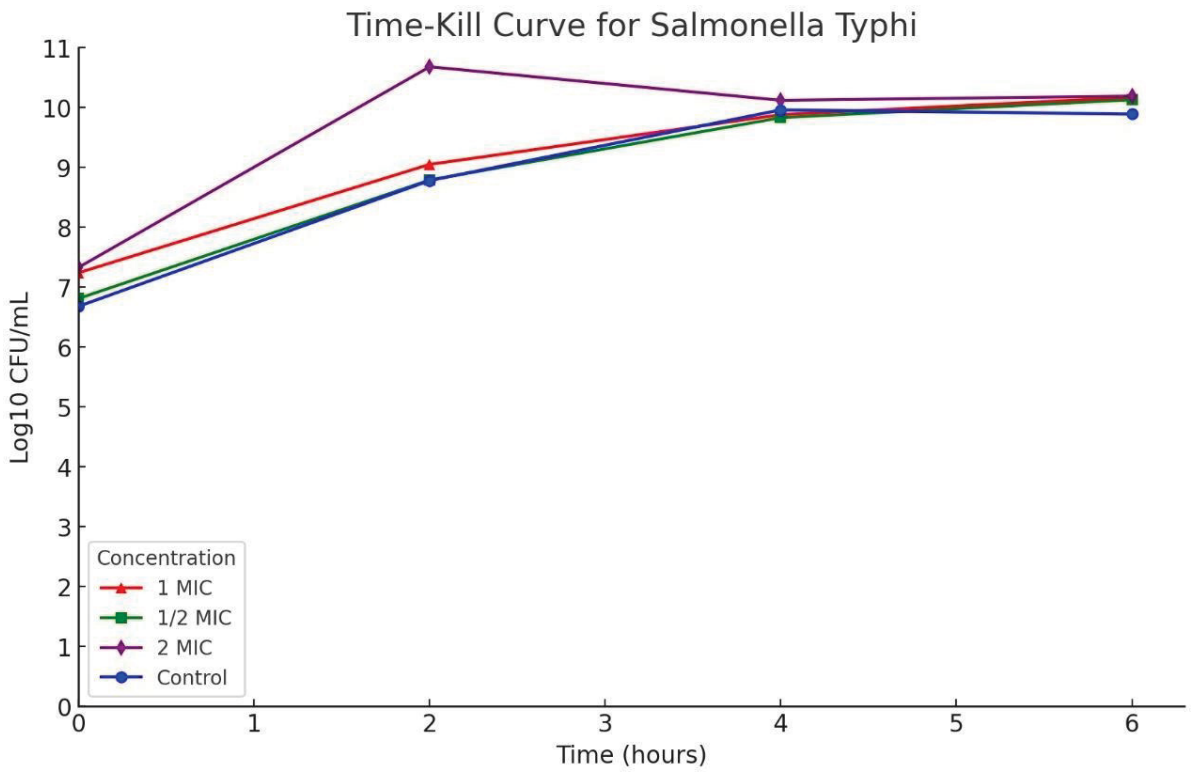
Em contrapartida, os resultados das análises de *Time Kill Assay* indicaram ação antimicrobiana do mel de *Melipona bicolor* contra a cepa selvagem de *S*. Heidelberg. Verificou-se que a ação antimicrobiana ocorreu no Tempo Zero com a concentração de 0,5% (½ MIC), o mesmo resultado não foi observado nos tempos 2, 4 e 6 nas concentrações ½ MIC, MIC e 2x MIC (FIGURA 2.4). Ainda, com relação à *S*. Typhimurium, não foi observado efeito antimicrobiano do mel no *Time Kill* (FIGURA 2.5).

FIGURA 2.4- Curva *Time Kill* do mel de *M.bicolor* contra *S.* Heidelberg



Fonte: Os Autores (2024)

FIGURA 2.5- Curva *Time Kill* do mel de *M.bicolor* contra *S.* Typhimurium



Fonte: Os Autores (2024)

Um dos fatores preponderantes sobre as características do produto é o período de colheita do mel. Neste trabalho, a colheita foi realizada durante o verão, com temperaturas variando entre 18 a 25°C ao longo do dia. Méis que são coletados durante a estação seca aparentam apresentar maior atividade antimicrobiana. Tal fator pode estar associado a uma menor diversidade de componentes fitoquímicos do néctar de flores em comparação com o período de chuva, em que há maior floração (MAHMOOD *et al*., 2021).

O armazenamento do mel em potes feitos de resina vegetal e cera também podem interferir na composição fitoquímica do mel, influenciando, consequentemente, a atividade antimicrobiana. Além da espécie da planta, deve-se considerar a sua capacidade de reagir fisiologicamente às mudanças ambientais, podendo aumentar ou diminuir a produção de determinada substância, com o objetivo de favorecer a sua nutrição, crescimento, manutenção e garantir a sobrevivência. Além disso, o ambiente e as condições meteorológicas do local de crescimento da planta influenciam o seu metabolismo e impactam diretamente na composição do néctar utilizado pela abelha para produzir o mel (BILUCA *et al*., 2016; PIMENTEL *et al*.,

2013).

Também é relevante considerar o método de conservação utilizado para preservar a integridade do mel. O mel utilizado no presente estudo foi refrigerado a 4°C. SILVA *et al*. (2022) demonstraram que o mel fresco e refrigerado de *Melipona quadrifasciata* foi eficaz na inibição de cepas de *E. coli*, *C. albicans* e *Salmonella.*

Em geral, a ação antimicrobiana também pode ser justificada pelo pH ácido do mel de abelha sem ferrão, que possui acidez natural alta, geralmente em torno de 4,5, inibindo o crescimento de muitos tipos de microrganismos. Por outro lado, o teor de açúcar, que é proporcional à quantidade de frutose e glicose, principalmente, cria um ambiente desfavorável para o crescimento microbiano, devido à alta osmolaridade (ROZMAN *et al*., 2022; NORDIN *et al*., 2018).

Ainda, existe uma variedade de enzimas presentes no mel de abelha sem ferrão, como a glicose oxidase, secretada pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas, que em contato com a água produz peróxido de hidrogênio, um componente que possui propriedades antimicrobianas, contribuindo para a atividade antimicrobiana geral do mel (BUCEKOVA *et al*., 2018; SOUSA *et al*., 2016;).

Proteínas presentes no mel de *Melipona beechei* foram evidenciadas como detentoras de um amplo espectro antimicrobiano, demonstrando maior susceptibilidade entre *E. coli* e *S. aureus* em relação a *S.* Typhimurium e *P. aeruginosa* (RAMÓN-SIERRA *et al*., 2022). As frações proteicas do mel relacionadas ao seu amplo espectro antimicrobiano podem estar relacionadas às proteínas e proteases, que podem causar o rompimento da membrana bacteriana, contribuindo para a perda da sua integridade (KIM & JIM, 2019).

Quanto às vitaminas, seu teor está diretamente relacionado à origem botânica e manuseio do mel após a coleta. As vitaminas niacina (B3) e folato (B9) foram detectadas anteriormente em mel *de Melipona quadrifasciata*. (SILVA *et al*., 2022). Algumas vitaminas podem apresentar efeito sinérgico quando testadas juntamente a antimicrobianos contra certos tipos de bactérias (SHAHZAD *et al*., 2018).

A presença de minerais está intrínsecamente ligada à fonte do néctar utilizado para a produção de mel pelas abelhas, pois o conteúdo de minerais depende da absorção do solo e do ambiente realizada pela planta. Foi reportada a presença de minerais como sódio, cálcio, magnésio, manganês e potássio em mel de *M. bicolor*, sendo este último o mais abundante (BILUCA *et al*., 2016). Minerais são capazes de proteger os tecidos contra danos dos radicais livres, no entanto, não há evidências que comprovem a ação antimicrobiana relacionada ao

perfil de minerais do mel de *Melipona* spp. (MWANGI *et al*., 2024).

Outra característica do produto é a presença de compostos fenólicos que podem estar associados à capacidade de inibição da ação microbiana. O conteúdo de compostos fenólicos é diretamente influenciado pela origem floral e geográfica, além das características climáticas locais (SHAMSUDIN *et al*., 2019). Amostras de mel produzido por abelhas da espécie *Melipona seminigra merrilae* no Amazonas apresentaram ação antimicrobiana contra *S. aureus, S. epidermidis, C. tropicalis, C. krusei, C. albicans, P. aeruginosa* e *E. coli.* As amostras que apresentaram melhor atividade antimicrobiana possuiam maior quantidade de compostos fenólicos totais (SILVA *et al*., 2013).

Dentre as classes de compostos fenólicos existentes em mel de abelha sem ferrão, os flavonoides constituem o principal grupo. Essas substâncias variam de acordo com a espécie de abelha e a fonte de néctar utilizada, e apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, inibindo o crescimento bacteriano de vários patógenos e microrganismos resistentes a antimicrobianos (BILUCA *et al*., 2017; KHONGKWANMUEANG *et al*., 2020). Tal mecanismo pode ser atribuído à capacidade dos flavonoides de formar complexos com proteínas solúveis e com a parede celular bacteriana, suprimir a síntese de ácidos nucleicos e o metabolismo energético, além da habilidade de afetar a permeabilidade da membrana celular, reduzir a capacidade de adesão e de formação de biofilme (VAOU *et al*., 2021).

Flavonoides são reconhecidos como compostos naturais capazes de atuar na prevenção e tratamento de várias doenças, especialmente doenças infecciosas relacionadas a bactérias patogênicas. Sua origem se dá por meio de metabólitos secundários produzidos por plantas, sendo comumente encontrados na natureza nas mais diversas estruturas químicas (SHAMSUDIN *et al*., 2022; COSME *et al*., 2020).

Perante o exposto, enfatiza-se o crescente interesse em gerar compostos antimicrobianos a base de produtos naturais (SHAMSUDIN *et al*., 2022). Desse modo, cientistas têm se empenhado para desenvolver estudos com esse propósito, entretanto trata-se de um trabalho árduo, envolvendo inúmeras etapas, pretendendo ampliar a eficácia e segurança destes compostos, além de permitir sua acessibilidade no mercado (LIU *et al*., 2024; DA SILVA *et al*., 2023; BALDIM *et al*., 2022).

Fatores isolados podem ou não ser suficientemente capazes de determinar a ação antimicrobiana. A combinação das características físico-químicas, microbiológicas, fatores entomológicos, caracterização fitogeográfica, compostos fitoquímicos, entre outros fatores, podem atuar de forma sinérgica, contribuindo simultaneamente com os benefícios presentes no

mel de abelha sem ferrão, incluindo ação antimicrobiana. No entanto, é necessário caracterizar de forma pontual a origem e os mecanismos envolvidos nesta ação, com o objetivo de vir a desenvolver compostos coadjuvantes que possam atuar diretamente no combate a infecções microbianas causadas por agentes patogênicos multirresistentes.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do atual panorama mundial da resistência antimicrobiana, é necessária a busca por alternativas para controlar e tratar infecções microbianas. Foi contatada ação antimicrobiana do mel de *M. bicolor* frente à *S*. Heidelberg por meio do método de *Time Kill Assay* no Tempo Zero na concentração de 0,5%. Diante disso, o mel de *Melipona bicolor* se apresenta como um potencial antimicrobiano frente à cepas de *S.* Heidelberg. No entanto, uma pesquisa mais aprofundada se faz necessária, com o objetivo de compreender quais processos podem estar envolvidos e qual composto presente no mel pode ser responsável por essa ação, além de investigar se há ação contra outras estirpes bacterianas.

REFERÊNCIAS

AIJAZ, M., Ahmad, M., Ansari, M. A., Ahmad, S. Antimicrobial Resistance in a Globalized World: Current Challenges and Future Perspectives. **International Journal of Pharmaceutical Drug Design**, v.1, n. 1, p. 7–22, 2023.

AONOFRIESEI, F., Lupsor, S. Inhibitory Potential of a Novel Imidazole Derivate as Evaluated by Time-Kill and Dehydrogenase Activity. **Current Microbiology**, v. 66, p. 162–168, 2013.

APOORVA, S. Behera, P., Sajjanar, B., Mahawar, M. Identification of oxidant susceptible proteins in *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Biology Reports**, v. 47, p. 2231–2242, 2020.

ARDAKANI, Z., Canali, M., Aragrande, M., Tomassone, L., Simões, M., Balzani, A., Beber, C.L. Evaluating the Contribution Of Antimicrobial use in Farmed Animals to Global Antimicrobial Resistance in Humans. **One Health**, v. 17, 100647, 2023.

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.

BALDIM, I., Paziani, M. H., Grizante Barião, P. H., Kress, M. R. V. Z., & Oliveira, W. P. Nanostructured lipid carriers loaded with Lippia sidoides essential oil as a strategy to combat the multidrug-resistant *Candida auris*. **Pharmaceutics**, v. 14, n.1, p.180, 2022.

BILUCA, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61–69, 2016.

BILUCA, F. C., de Gois, J. S., Schulz, M., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Maltez, H. F., Fett, R. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89–97, 2017.

BUCEKOVA, M., Buriova, M., Pekarik, L. Majtan, V., Majtan, J. Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. **Scientific Reports**, v.8, 9061, 2018.

BRAGHINI, F., Biluca, F.C., Gonzaga, L.V., Kracik, A. S., Vieira, C. R. W., Vitali, L., Micke, G. A., Costa, A. C. O., Fett, R. Impact of short-term thermal treatment on stingless bee honey (Meliponinae): Quality, phenolic compounds and antioxidant capacity. **Journal of food processing and Preservation**, v.43, n.7, e13954, 2019.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasil em 50 alimentos / Embrapa. – Brasília, DF: **Embrapa**, 2023. 359 p.

CARRASCOSA, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., Raposo, A., Microbial Biofilms in the Food Industry- A Comprehensive Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 4, 2021.

CHLEBICZ, A., Śliżewska, K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. **International Journal of Environment Research and Public Health**, v. 15, n.5, p. 863, 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, 2012. Methods for dilution antibacterial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. In: CLSI Document M07-A9, 9th ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA.

CLOTHIER, K.A., Byrne, B.A. Phenotypic and Genotypic Characterization of Animal-Source *Salmonella* Heidelberg Isolates. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2016:6380890, 2016.

COSME, P., Rodríguez, A. B., Espino, J., Garrido, M. Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. **Antioxidants**, v. 9, n.12, 1263, 2020.

CUNY, C., Layer-Nicolaou, F., Werner, G., Witte, W. A look at staphylococci from the one health perspective. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 314, 151604, 2024.

DA SILVA, B. S., Díaz-Roa, A., Yamane, E. S., Hayashi, M. A., & Junior, P. I. S. Doderlin: Isolation and characterization of a broad-spectrum antimicrobial peptide from *Lactobacillus acidophilus*. **Research in Microbiology**, v. 174, n.3, 103995, 2023.

DOMINGOS, S. C. B., Clebis, V. H., Nakazato, G., de Oliveira Jr, A. G. O., Kobayashi, R. K. T., Peruquetti, R. C., Pereira, C. D., Rosa, M. T. S., Medeiros, L. S. Antibacterial activity os honeys from Amazonian stingless bees os *Melipona* spp. And its effects on bacterial cell morphology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.101, n.5, 2072-2077, 2021.

FALEIROS-QUEVEDO, M. Francoy, T. M. Stingless bees honeys': physical-chemical characterization, difficulties and challenges. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e25411628996-e25411628996, 2022.

HOFACRE, C. L., Rosales, A. G., da Costa, M., Cookson, K., Schaeffer, J., Jones, M. K. Immunity and Protection Provided by Live Modified Vaccines Against Paratyphoid *Salmonella* in Poultry—An Applied Perspective. **Avian diseases**, v.65, n.2, p. 295–302, 2021.

HOWDEN, B. P., Giulieri, S. G., Lung, T. W. F., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. K., Hachani, A., Monk, I. R., Stinear, T. P. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, 21, 380–395, 2023.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: ICMBio, 2018.

KHONGKWANMUEANG, A., Nuyu, A., Straub, L., & Maitip, J. Physicochemical Profiles, Antioxidant and Antibacterial Capacity of Honey from Stingless Bee *Tetragonula laeviceps* Species Complex. **E3S Web of Conferences**, v. 141, n. 03007, 2020.

KIM, B. Y., Jin, B. R. Antimicrobial activity of the C-terminal of the major royal jelly protein 4 in a honeybee (Apis cerana). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, n.2, 561–564,

2019.

LIU, G. Y., Yu, D., Fan, M. M., Zhang, X., Jin, Z. Y., Tang, C., & Liu, X. F. (2024). Antimicrobial resistance crisis: could artificial intelligence be the solution? **Military Medical Research**, v.11, n.1, p.7, 2024.

MAHMOOD, A. L., Lani, M. N., Hassan, Z., Razak, S. B. A., Ahmad, F. T. Antioxidant and antimicrobial properties of Indo-Malayan stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey from different seasons and distribution of flowers. **Food Research**, v. 5, n. 2, p. 498–507, 2021.

MIRANDA, A.B., Reinert, L. H., Meneguello, J. E., Ieque, A. L., Siqueira, V. L. D., de Lima Scodro, R. B., Cardoso, R.F., Caleffi-Ferracioli, K. R.. Emprego de reveladores oxirredutores e de leitura automatizada na determinação da atividade de fármacos em bactérias de importância médica. **Revista Uningá**, v. 60, p. eUJ4398-eUJ4398, 2023.

MWANGI, M. W., Wanjau, T. W., Omwenga EO. Stingless bee honey: Nutritional, physicochemical, phytochemical and antibacterial validation properties against wound bacterial isolates. **PLoS One**, v.19, n.5, e0301201, 2024.

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

NORDIN, A., Sainik, N. Q. A. V., Chowdhury, S. R., Saim, A. Bin, & Idrus, R. 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.

OBE, T., Nannapaneni, R., Sharma, C. S., & Kiess, A. Homologous stress adaptation, antibiotic resistance, and biofilm forming ability of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg ATCC8326 on different food-contact surfaces following exposure to sublethal chlorine concentrations. **Poultry science**, v. 97, n.3, 951-961, 2018.

ORGANIZATION, W.H. Antimicrobial Resistance. 2023. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 31 maio. 2024.

PIMENTEL, R. B. D. Q., 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. 1-14, 2013.

PULINGAM, T., Parumasivam, T., Gazzali, A.M., Sulaiman, A.M. [a], Yee Chee J., Lakshmanan, M., Chin, C.F. [a], Sudesh, K. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, n. 1, 2022.

SHAHZAD, S., Ashraf, M. A., Sajid, M., Shahzad, A., Rafique, A., Mahmood, M. S. Evaluation of synergistic antimicrobial effect of vitamins (A, B1, B2, B6, B12, C, D, E and K) with antibiotics against resistant bacterial strains. **Journal of global antimicrobial resistance**, v.13, p. 231-236, 2018.

SHAMSUDIN, N.F., Ahmed, Q.U., Mahmood, S., Ali Shah, S.A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M.A., Parveen, H., Zakaria, Z.A. Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. **Molecules**, v. 27, 1149, 2022.

SHAMSUDIN, S., Selamat, J., Sanny, M., Abd. Razak, S. B., Jambari, N. N., Mian, Z., & Khatib, A. Influence of origins and bee species on physicochemical, antioxidant properties and botanical discrimination of stingless bee honey. **International Journal of Food Properties**, v.22, n.1, 239–264, 2019.

SILVA, I. A. A., Silva, T. M. S., Camara, C. A., Queiroz, N., Magnani, M., Novais, J. S., Soledade, L. A. B., Lima, E. O., Souza, A. L., Souza, A. G. Phenolic profile, antioxidante activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, vol. 141, pág. 3552-3558, 2013.

SILVA, T. M. F. S. S., Ávila, S., Matos, M. G., Junkert, A. M., Frizon, C. N. T., Pontarolo, R., Beux, M. R., Ferreira, S. M. R. Effect of preservation methods on antimicrobial activity, and nutritional and microbiological quality of *Melipona quadrifasciata* bee honey. **Journal of Food Processing and Preservation**, 00:e16917, 2022.

SOARES, L. S. G., Casella, T., Kawagoe, E. K., Filho, V. B., Omori, W. P., Nogueira, M. C. L., Wagner, G., de Oliveira, R. R., Stahlhofer, S. R., Ferreira, F. A., Tondo, E. C., Linder, J. D. D. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance of *Salmonella* Heidelberg in the south of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 391–393, 110151, 2023.

SOUSA, J. M., de Souza, E. L., Marques, G., Meireles, B., de Magalhães Cordeiro, Â. T., Gullón, B., Pintado, M. M., Magnani, M. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 84, p. 61-68, 2016.

SODAGARI, H. R., Wang, P., Robertson, I., Habib, I., and Sahibzada, S. Non-Typhoidal *Salmonella* at the human-food-of-animal-origin interface in Australia. **Animals** 10:1192, 2020.

QYN, Z., Yu, S., Chen, J., Zhou, J. Dehydrogenases of acetic acid bacteria**. Biotechnology Advances**, v. 54, 107863, 2022.

RAMÓN-SIERRA, J. M., Villanueva, M. A., Yam-Puc, A., Rodríguez-Mendiola, Arias-Castro, C., Ortiz-Vazquez, E. Antimicrobial and antioxidant activity os proteins isolated from *Melipona beecheii* honey. **Food Chemistry: X**, v.13, 100177, 2022.

ROZMAN, A. S., Hashim, N., Maringgal, B., Abdan, K. A Comprehensive Review of Stingless Bee Products: Phytochemical Composition and Beneficial Properties of Honey, Propolis, and Pollen. **Applied Sciences**, v.12, n.13, 6370, 2022.

TUKSITHA, L., Chen, Y. S., Chen, Y., Wong, K., Peng, C. Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, vol 21, pág. 563-570, 2018.

VAOU, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., Bezirtzoglou, E. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. **Microorganisms**, v.9, 2041, 2021.

VELTHIUS, H.W., De Vries, H., Imperatriz-Fonseca, V.L. The polygyny of *Melipona bicolor*: scramble competition among queens. Apidologie, v.37 n.2, p. 222-239, 2006.

WHO (2020). Food Safety. Geneva: WHO