

**FRANCIELI BRAGHINI**

**ESTABILIDADE DE MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO  
(*Meliponinae* spp.) SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES  
TÉRMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roseane Fett

**FLORIANÓPOLIS  
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Braghini, Francieli  
Estabilidade de méis de abelhas sem ferrão (Meliponinae  
spp.) submetidos a diferentes condições térmicas /  
Francieli Braghini ; orientadora, Roseane Fett -  
Florianópolis, SC, 2016.  
156 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Mel. 3. Meliponinae. 4.  
Tratamentos térmicos. 5. Estabilidade. I. Fett, Roseane .  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**ANEXAR FOLHA COM ASSINATURAS**



Ao meu pai, Edison Luis Braghini (in memoriam).  
**Dedico.**



## AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, por isso quero agradecer, primeiramente, a TODOS (AS), sem exceção, seja por um pensamento positivo, uma palavra, uma ajuda, um sorriso, um conselho... enfim qualquer que tenha sido a contribuição, sintam-se agradecidos (as).

Como agradecimento especial:

Ao meu bom e querido Deus, que desde sempre tem realizado meus sonhos, me proporcionando somente alegrias.

A Nossa Senhora Aparecida, que apesar de eu não ser devota, sei que tem guiado meu caminho, me protegendo, principalmente a pedido de minhas avós Salete e Gessi.

Ao José Francisco dos S. Silveira Júnior, meu amor, fiel e companheiro, por todo amor, dedicação, cumplicidade, alegria, apoio, conselhos, incentivo, paciência... Em resumo: por estar presente em todos os momentos da minha vida! Muito obrigada!

À minha sogra Maria Rejane Rajab, que sempre depositou todos seus esforços para que eu chegasse aqui com o mínimo de dificuldade possível. Pela inspiração que ela me fornece, pela mulher acolhedora, determinada e profissional que é. Minha gratidão!

À professora Dra. Roseane Fett, minha orientadora, pela oportunidade em participar do seu grupo de pesquisa. Obrigada pelo apoio e confiança.

Ao Luciano V. Gonzaga, pelos conhecimentos adquiridos, pelas sugestões, pelas dicas, pelos ensinamentos, por ser parte fundamental na realização deste trabalho.

As colegas, amigas e companheiras do Laboratório de Química de Alimentos (LabQA): Priscila Nehring, Fabíola C. Biluca, Mônia S. Azevedo, Mayara Schulz, Roberta G. Barbosa, Siluana K. T. Seraglio, Priscila Missio da Silva, Fabiana Della Betta, Claudia B. B. Arroyo, Greice Bergamo e Andressa C. Valesse pelas importantíssimas ajudas teóricas e práticas, além dos incontáveis momentos de descontração, essenciais no dia-a-dia. Também as alunas de iniciação científica Laís Morilla e Letícia Vanderlinde por estarem sempre dispostas a auxiliar no que fosse necessário.

Um agradecimento mais que especial a Fabíola C. Biluca, que desde sempre, desde que a conheci na UTFPR, tem sido um anjo na minha vida. Lembro-me das nossas primeiras conversas sobre o mel de abelhas sem ferrão, ela já no mestrado e eu ainda na graduação, e da nossa vontade em trabalhar juntas. Só tenho a agradecer por sua

dedicação a este trabalho e pelas inúmeras ajudas, por ser essa pessoa maravilhosa e excelente companheira de trabalho. Obrigada!

Ao professor Dr. Luciano Vitalli por todas as sugestões e principalmente pelo auxílio na realização da análise dos compostos fenólicos.

Aos professores e demais funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos pela dedicação e todos os ensinamentos repassados. Especialmente a professora Dra. Ana Carolina de O. Costa, admirável profissional, por todas suas contribuições.

À minha mãe Leci L. Boff e minha irmã Caroline de S. Nunes por todo amor, beijos e abraços doados a cada ida para casa. Certamente foram revigorantes para a volta ao trabalho.

A todas as pessoas que conheci em Floripa, que participaram de forma incrível no meu crescimento. Não tenho palavras para agradecer todo o bem que me fizeram e fazem e quão importante foi a chegada de vocês na minha vida. Foi encontro de almas, de outras vidas, sem dúvida. Gratidão: Ana Luiza Brasil, Luiz Cesar Aguiar (LuCA), Gabriela Brasil, Zannis Andrade, Rui Florêncio, Jaqueline Kassick, Jean Paul, Jonas S. Albuquerque, Família Reis, Anna Fontoura, Joy Souza e Daniel e Eveline Fontoura.

Aos meliponicultores pelo fornecimento das amostras de mel de abelhas sem ferrão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

*“Abelha fazendo o mel, vale o tempo que não voou. [...]. Todo dia é de viver, para ser o que for e ser tudo. Sim, todo amor é sagrado, e o fruto do trabalho é mais que sagrado”.*

(Trechos da música “Amor de Índio”, de Beto Guedes e Ronaldo Batos).



## RESUMO

BRAGHINI, Francieli. **Estabilidade de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) submetidos a diferentes condições térmicas.** 2016. 155p. Dissertação (Mestrado Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

O mel produzido pelas abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) é um produto com características próprias e destaca-se por apresentar propriedades nutricionais, sensoriais e terapêuticas distintas do mel de *Apis mellifera*. No entanto, a comercialização deste produto enfrenta alguns entraves, principalmente quanto a sua estabilidade, devido a sua composição particular que apresenta maior umidade e acidez, tornando-o mais susceptível a fermentação por ação das leveduras. Desta forma, a busca por processos tecnológicos que mantenham sua estabilidade por maior tempo possível se faz necessário, desde que estes não afetem as características do produto *in natura*, mantendo padrões de identidade e qualidade. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da submissão de amostras a diferentes condições térmicas sobre a estabilidade dos méis. No estudo foram avaliadas dez amostras de méis de abelhas sem ferrão, coletadas no estado de Santa Catarina, submetidas aos tratamentos recomendados pela legislação de mel de *Apis mellifera* (52°C/470min; 54,5°C/170min; 57°C/60min; 59,5°C/22min; 65,5°C/7,5min; 65,5°C/2,8min; 68°C/1min e 71,1°C/24s) em uma primeira etapa do estudo. Em uma segunda etapa do estudo uma amostra de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*), selecionada dentre as amostras analisadas, foi submetida a tratamentos utilizando temperatura mais elevadas e tempos curtos de processamento (90, 92,5 e 95°C durante 15, 30 e 60s). Ao final dos processos as amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros de identidade e qualidade, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Para a amostra de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*), além destas análises foi realizada a identificação de compostos fenólicos por LC-MS/MS e verificação da eficiência de redução da carga microbiana através da análise de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. Os resultados mostraram que os tratamentos recomendados pela legislação brasileira para mel de *Apis mellifera* podem ser aplicados a méis de abelhas sem ferrão, sem que ocorram danos as características físico-químicas. Os tratamentos térmicos com aplicação de temperaturas elevadas e curto período de processamento, mostraram grande potencial a serem utilizados nos entrepostos de mel, sem que suas características

sejam alteradas. Principalmente no que diz respeito a qualidade, tendo em vista que o mel apresentou resistência à formação de 5-hidroxiacetilfurfural, bem como a manutenção dos compostos fenólicos identificados na amostra *in natura*, além de reduzir a carga microbiana presente.

**Palavras-chave:** Mel. Meliponinae. Tratamentos térmicos. Estabilidade

## ABSTRACT

The honey produced by stingless bees (Meliponinae) is a product with its own characteristics and stands out for presenting nutritional properties, sensory and therapeutic distinct of *Apis mellifera* honey. However, the marketing of this product faces some obstacles, particularly how much its stability, due to its particular composition that has a higher moisture and acidity, making it more susceptible to fermentation by the action of yeast. Thus, the search for technological processes that maintain its stability for as long as possible is necessary, provided these do not affect the characteristics of the product *in natura*, maintaining identity and quality standards. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of submission of samples to different thermal conditions on the stability of the honeys. In the study we were evaluated ten samples of honey from stingless bees collected in the state of Santa Catarina, submitted to treatments recommended by honey legislation of *Apis mellifera* (52°C/470min; 54,5°C/170min; 57°C/60min; 59,5°C/22min; 65,5°C/7,5min; 65,5°C/2,8min; 68°C/1min e 71,1°C/24s) in a first stage of the study. In a second stage of the study, a honey sample of guarairo (*Melipona bicolor*), selected from among the examined samples was subjected to treatments using higher temperature and short processing times (temperature of 90, 92,5 e 95°C por 15, 30 e 60s). At the end of the process the samples were analyzed for identity and quality parameters, total phenolic compounds and antioxidant activity. For the sample of honey of guarairo, besides these analyzes it was performed identification of phenolic compounds by LC-MS/MS and verification of microbial load reduction efficiency by analysis of yeasts and molds, coliforms and *Salmonella* spp. The results showed that the treatments recommended by Brazilian legislation for *Apis mellifera* honey can be applied to honey from stingless bees, without the occurrence of the physicochemical characteristics damage. The heat treatment with the application of high temperature and short processing time have shown great potential for use in honey depots without its characteristics being altered. Especially as regards the quality, in view of the honey showed resistance to the formation of 5-hydroxymethylfurfural as well as maintaining the phenolic compounds in the sample identified in nature and reduce the microbial load present.

**Keywords:** Honey. Meliponinae. Heat treatment. Stability.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Comparação da morfologia de <i>Apis mellífera</i> e abelhas sem ferrão (Meliponinae). .....	31
Figura 1.2 – Algumas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae) e sua terminologia popular.....	32
Figura 1.3 - Entrada da colmeia de diferentes espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae). .....	33
Figura 1.4 – Estrutura física de colmeia de abelhas sem ferrão (Meliponinae) com favos de cria e potes contendo mel e pólen. ....	34
Figura 1.5 - Potes de mel e pólen de algumas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae). .....	34
Figura 1.6 - Principais espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae) produtoras em diferentes regiões do Brasil. ....	36
Figura 1.7 – Representação proporcional das principais espécies mantidas por 246 meliponicultores brasileiros.....	37
Figura 1.8 – Representação proporcional dos principais problemas que afetam a meliponicultura no Brasil, conforme identificado por 230 produtores.....	38
Figura 2.1 - Correlação obtida entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP).....	87
Figura 2.2 - Teores de umidade de méis de abelhas sem ferrão (Meliponinae) submetidos aos tratamentos térmicos recomendados pela legislação.....	89
Figura 2.3 - Valores de pH de méis de abelhas sem ferrão (Meliponinae) submetidos aos tratamentos térmicos recomendados pela legislação....	92

Figura 3.1- Esquematização da aplicação do tratamento térmico em mel de guaraipe (*Melipona bicolor*). ..... 116

Figura 3.2 - Correlação obtida entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade redutora FRAP. .... 126

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Sugestão de regulamentação para mel de abelhas sem ferrão da Venezuela, comparada com a regulamentação oficial da <i>Codex Alimentarius Commission</i> para mel de <i>Apis mellífera</i> . .....	42
Tabela 1.2 – Sugestão de regulamentação para mel de abelhas sem ferrão do Brasil, comparada a legislação atual brasileira para mel de <i>Apis mellífera</i> . .....	42
Tabela 2.1 - Identificação das espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae), sua terminologia popular, localidade de origem e florada predominante.....	70
Tabela 2.2 - Recomendação do binômio tempo/temperatura para méis de <i>Apis mellífera</i> , através da Portaria n° 6 de 25 julho de 1985.....	75
Tabela 2.3 - Características físico-químicas determinadas nas amostras de mel de abelhas sem ferrão (Meliponinae) <i>in natura</i> .....	76
Tabela 2.4 - Conteúdo de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e atividade diastásica determinados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão <i>in natura</i> (Meliponinae). .....	80
Tabela 2.5 - Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose e sacarose encontradas nas amostras de mel de abelhas sem ferrão <i>in natura</i> (Meliponinae).....	82
Tabela 2.6 - Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão <i>in natura</i> (Meliponinae). .....	85
Tabela 2.7 - Características físico-químicas determinadas nos méis de abelhas sem ferrão (Meliponinae) <i>in natura</i> e após tratamentos térmicos. ....	97
Tabela 2.8 - Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose, sacarose encontrados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão <i>in natura</i> (Meliponinae) e após tratamentos térmicos.....	99

Tabela 2.9 - Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão <i>in natura</i> (Meliponinae) e após tratamentos térmicos.....	102
Tabela 3.1- Características físico-químicas determinadas em mel de guaraiço (Melipona bicolor) <i>in natura</i> e após tratamentos térmicos. .	117
Tabela 3.2 - Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose e sacarose encontrados na amostra de mel de guaraiço ( <i>Melipona bicolor</i> ) <i>in natura</i> e após tratamentos térmicos. ....	121
Tabela 3.3 - Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de mel de guaraiço ( <i>Melipona bicolor</i> ) <i>in natura</i> e após tratamentos térmicos.....	124
Tabela 3.4 - Parâmetros do espectrômetro de massas obtidos pela infusão dos padrões de compostos fenólicos. ....	127
Tabela 3.5 - Compostos fenólicos identificados nas amostras de mel de guaraiço ( <i>Melipona bicolor</i> ) <i>in natura</i> e após tratamentos térmicos. .	128
Tabela 3.6 - Cargas microbianas de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e <i>Salmonella</i> spp. na amostra de mel de guaraiço ( <i>Melipona bicolor</i> ) <i>in natura</i> contaminada e após tratamento térmico (90°C/60s).....	130

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- 5 - HMF - 5- hidroximetilfurfural  
Aa - atividade de água  
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
EAA - equivalentes a ácido ascórbico  
EAG - equivalentes a ácido gálico  
CE - eletroforese capilar (*do inglês, capillary electrophoresis*)  
F/G – razão frutose/glicose  
FeCl<sub>3</sub> – cloreto férrico  
FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – sulfato de ferro heptahidratado  
FRAP - Poder de Redução do Ferro (*do inglês, Ferric Reducing Antioxidant Potential*)  
G/U - razão de glicose/umidade  
HCl - ácido clorídrico  
IR- índice de refração  
LC/MS-MS – cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (*do inglês: Liquid chromatography - tandem mass spectrometry*)  
LOQ - limite de quantificação (*do inglês, limit of quantification*)  
m/m - razão massa/massa  
m/v - razão massa/volume  
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
mbar - milibar  
MEKC - cromatografia eletrocínética micelar capilar (*do inglês, micellar electrokinetic chromatography*)  
mEq - miliequivalente (s)  
mS - milisiemens  
NaCl - cloreto de sódio  
NaOH - hidróxido de sódio  
SDS - dodecil-sulfato de sódio  
TBS - tetraborato de sódio  
TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina  
v/v – razão volume/volume



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>27</b>
1 ABELHAS SEM FERRÃO: CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	29
2 MELIPONICULTURA .....	36
3 MEL: IDENTIDADE E QUALIDADE, MICROBIOLOGIA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	39
3.1 Parâmetros de identidade e qualidade .....	40
3.2 Microbiologia.....	46
3.3 Atividade antioxidante .....	47
4 COMPONENTES INERENTES AO MEL E SUA ESTABILIDADE	50
4.1 Umidade.....	50
4.2 Açúcares.....	51
4.3 Acidez livre e pH .....	52
4.4 Condutividade elétrica .....	52
4.5 5-Hidroxiacetilfurfural .....	53
4.6 Diastases .....	54
5 TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO DO MEL.....	56
5.1 Tratamento térmico .....	57
6 TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS.....	58
6.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS - do inglês: <i>Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i> ).....	59
6.2 Eletroforese capilar (CE – do inglês: <i>Capillary electrophoresis</i> ) .....	60
<b>CAPÍTULO 2 - ESTABILIDADE QUÍMICA DE MÊIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (Meliponinae) SUBMETIDOS AOS GRADIENTES TÉRMICOS SUGERIDOS PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA VIGENTE PARA MÊIS DE <i>Apis mellifera</i></b> .....	<b>63</b>
RESUMO .....	65
1 INTRODUÇÃO.....	67
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
2.1 Material.....	68

2.2 Amostras .....	69
2.3 Parâmetros de Identidade e Qualidade.....	70
2.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	73
2.5 Gradientes térmicos .....	74
2.6 Análise Estatística.....	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
3.1 Parâmetros de identidade e qualidade para méis <i>in natura</i> .....	76
3.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante para méis <i>in natura</i> .....	84
3.3 Avaliação da umidade, pH e 5-HMF em méis após tratamentos térmicos recomendados pela legislação.....	87
3.4 Parâmetros de identidade e qualidade em méis após tratamento térmico.....	95
3.5 Compostos fenólicos e atividade antioxidante em méis após tratamento térmico.....	101
4 CONCLUSÃO .....	103

**CAPÍTULO 3 - ESTABILIDADE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE MEL DE GUARAÍPO (*Melipona bicolor*) APÓS TRATAMENTOS TÉRMICOS COM ELEVADA TEMPERATURA E CURTO TEMPO DE PROCESSAMENTO 104**

RESUMO.....	107
1 INTRODUÇÃO .....	109
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	110
2.1 Material.....	110
2.2 Amostras .....	111
2.3 Parâmetros de Identidade e Qualidade.....	112
2.4 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante .....	112
2.5 Identificação dos compostos fenólicos .....	113
2.6 Análises microbiológicas.....	114
2.7 Aplicação do tratamento térmico.....	115
2.8 Análise Estatística.....	116
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
3.1 Parâmetros de identidade e qualidade.....	116
3.2 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante .....	123

3.3 Identificação de compostos fenólicos .....	126
3.4 Análise microbiológica .....	130
4 CONCLUSÃO.....	132
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>133</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>135</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>154</b>
APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO UTILIZADO NO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS. ....	154
APÊNDICE B – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZADO NO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH. ....	155
APÊNDICE C – CURVA PADRÃO DE SULFATO FERROSO HEPTAHIDRATADO UTILIZADO NO MÉTODO DO PODER DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP).....	156



## INTRODUÇÃO

A criação de abelhas tem sido realizada desde os séculos antigos, onde a produção de mel e seus derivados (cera, pólen, própolis) serviam basicamente para consumo próprio, sendo o mel, muitas vezes, a única fonte de açúcar. Com o passar dos tempos, tal atividade tornou-se rentável, difundindo-se por todo o mundo (GUERRINI et al., 2009). No Brasil, a prática racional de manejo de abelhas começou com a utilização de abelhas africanizadas (cruzamento de abelhas europeias com africanas), por serem mais produtivas e rentáveis (SHEPPARD et al., 1991). No entanto, antes mesmo da introdução destas abelhas, a criação de abelhas sem ferrão era realizada pelos índios, para fins de consumo e utilização própria (CARVALHO et al., 2005).

Atualmente no Brasil são empregados dois tipos de criação de abelhas: apicultura e meliponicultura. A apicultura é a criação racional de abelhas *Apis mellifera*, com maior produção e comercialização, amplamente estudada e difundida. E a meliponicultura é a criação de abelhas sem ferrão, com volume de produção ainda pouco expressivo e baixa comercialização, devido principalmente à falta de regulamentação do produto (OLIVEIRA et al., 2012).

Nativas do território brasileiro, as abelhas da subfamília Meliponinae são conhecidas como abelhas sem ferrão por possuírem ferrão atrofiado ou ausência do mesmo, sendo incapazes de ferocar, tornando-se dóceis para o manejo. Apresentam características bem distintas das demais espécies de abelhas, como coleta de néctar de plantas rasteiras, revoadas curtas na procura dos alimentos, colmeias no sentido horizontal e sem elaboração de favos. Tais particularidades tornam seus produtos, em especial o mel, com características próprias, apresentando sabor e textura inigualáveis (CARVALHO et al., 2005; VILLAS-BÔAS, 2012).

Os produtos das abelhas sem ferrão têm conquistado espaço nas indústrias que procuram ingredientes naturais como base para seus produtos. Em paralelo, observa-se uma demanda crescente de mercado nacional e internacional, com comercialização a preços mais elevados quando comparados ao mel das abelhas do gênero *Apis* (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013). Porém, a distribuição deste produto ainda é limitada, devido principalmente à falta de regulamentação de padrões de identidade e qualidade, uma vez que a atual legislação é específica para mel de *Apis mellifera* e também pela baixa vida de prateleira, já que este

mel possui naturalmente maior teor de umidade e acidez (BILUCA et al., 2014).

Na busca por processos tecnológicos que visem estender a vida de prateleira deste produto, o tratamento térmico tem sido apontado como alternativa, por minimizar a carga microbiana existente e evitar a fermentação precoce. No entanto, tal processo deve primar pela manutenção das características originais, mantendo padrões de identidade e qualidade, destacando-se a necessidade de realização de estudos quanto à estabilidade destes méis.

Desta maneira, considerando a escassez de estudos e a necessidade de processos adequados para o beneficiamento do mel, a proposta de trabalho busca avaliar o efeito de diferentes condições térmicas aplicadas a méis de abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina. Definindo as melhores condições de tratamento onde as características originais do produto se mantem estável, possibilitando, desta forma, um sistema de manejo adequado ao produtor, além da viabilidade de comercialização do produto.

O trabalho está apresentado em três capítulos, organizados da seguinte forma: Capítulo 1 apresenta revisão bibliográfica contextualizada sobre o mel de abelhas sem ferrão (Meliponinae), suas principais características, composição e estabilidade. O Capítulo 2 trata da estabilidade química de méis de abelhas sem ferrão (Meliponinae) quando submetidos a tratamentos térmicos sugeridos pela legislação brasileira para mel de *Apis mellífera*, através da realização de parâmetros de identidade e qualidade, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. E o Capítulo 3 aborda a estabilidade química e características microbiológicas de mel de abelhas guaraipe (*Melipona bicolor*) submetidos a temperaturas elevadas por curtos períodos de tempo, com avaliação pré e pós tratamento dos parâmetros de identidade e qualidade, compostos fenólicos (totais e identificação) e atividade antioxidante, e avaliação da eficiência do tratamento térmico na eliminação de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1 ABELHAS SEM FERRÃO: CARACTERÍSTICAS GERAIS

No mundo existe uma ampla diversidade de espécies de abelhas, cada uma apresentando características próprias de comportamento, nível de sociabilidade, preferências alimentares, dentre outros. As abelhas sem ferrão, nativas do Brasil, pertencem à superfamília Apoidea, as quais estão agrupadas na família Apidae, que se subdivide em quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. Nas abelhas dessas subfamílias, somente as Meliponinae possuem o ferrão atrofiado, a qual pode ser dividida em três tribos: Meliponini, Trigonini e Lestrimellitini (KERR, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012).

Segundo Kerr (1996), a classificação zoológica completa destas abelhas é ilustrada no Quadro 1.1.

Quadro 1.1 - Classificação zoológica completa das abelhas sem ferrão (Meliponinae).

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

Fonte: Keer (1996).

As Meliponini possuem um único gênero (Melipona) com mais de 50 espécies descritas. As abelhas são um pouco maiores do que as pertencentes à tribo Trigonini e suas colônias possuem um número menor de indivíduos, porém a principal característica que difere as tribos é o mecanismo de formação da rainha. Na tribo Meliponini não há célula real, ou seja, rainhas, operárias e machos, nascem e se desenvolvem dentro de células de cria iguais e a determinação da quantidade de rainhas que nascem dentre todos os ovos disponíveis é definido por uma proporção genética (GUERRINI et al., 2009; VILLAS-BÔAS, 2012).

A tribo Trigonini possui dez gêneros e aproximadamente 120 espécies, algumas delas, como a *Oxytrigona tataira* (caga-fogo) são

agressivas e ao serem manejadas liberam uma substância ácida (geralmente ácido fórmico) a partir de suas glândulas salivares, capaz de queimar a pele. Outras, como as do gênero *Scaptotrigonas*, apesar de não ferroarem, podem machucar pela força mandibular (KERR, 1996). No entanto, para prática racional de manejo destas abelhas (meliponicultura) as espécies frequentemente utilizadas apresentam-se dóceis. Suas colônias variam de 300 a 80.000 abelhas e são caracterizadas pela presença de célula real, as quais possuem tamanho maior do que as células comuns, fazendo com que as larvas que se desenvolvem neste tipo de célula recebam mais alimento, o que designa uma nova rainha virgem, conhecidas como princesas (VILLAS-BÔAS, 2012; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Há também uma terceira tribo, chamada Lestrimellitini, um grupo muito pequeno de abelhas que possuem como principal característica a ausência da estrutura coletora de pólen, além de que, estas abelhas não conseguem realizar a coleta do seu próprio alimento, vivendo exclusivamente do roubo de alimento de outras espécies (NOGUEIRA-NETO et al., 1986; NOGUEIRA-NETO, 1997).

As abelhas sem ferrão vivem somente em colônia, são eussociais, havendo sobreposição de geração e divisão de trabalho entre as castas. Em suas colônias existem três tipos básicos de indivíduos: as rainhas (poedeiras ou virgens), as operárias e os machos (VILLAS-BÔAS, 2012).

As rainhas poedeiras são responsáveis pela postura de ovos que dão origem a todos os tipos de abelhas e também pela organização da colônia, já as rainhas virgens são poedeiras em potencial, que em caso de morte ou enxameamento (emigração) da rainha poedeira esta a substitui (NOGUEIRA-NETO, 1997; CARVALHO-ZILSE et al., 2012).

As operárias não são fecundadas e representam a maior parte da colônia, chegando a mais de 80% dos indivíduos. Seu trabalho é realizar a manutenção geral da colônia, e as tarefas a serem desenvolvidas fica restrita a idade, onde as mais jovens realizam trabalho interno e à medida que envelhecem trabalhos externos, cuidando da defesa, manipulando materiais de construção da colmeia, coletando e processando o alimento (NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012).

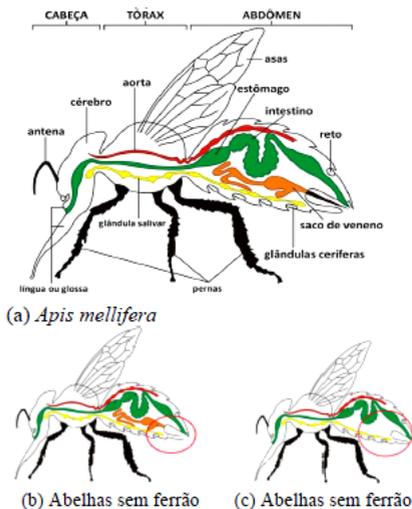
Enquanto que os machos são os indivíduos reprodutores e seu principal objetivo é acasalar as rainhas virgens, realizando esporadicamente alguns pequenos trabalhos, como desidratação do néctar e manipulação da cera e ajudando na construção da estrutura do

ninho (NOGUEIRA-NETO, 1997; CARVALHO-ZILSE et al., 2012; VILLAS-BÔAS, 2012).

As abelhas sem ferrão possuem características bem distintas entre suas espécies, diferentemente, por exemplo, das subfamílias *Apis* e *Bombus* onde suas espécies são reunidas em um mesmo gênero, sem grandes modificações. Nas abelhas sem ferrão as diferenças concentram-se principalmente na morfologia, hábitos de nidificação (construção do ninho), comportamento e ecologia (KLEINERT et al., 2009).

A morfologia das abelhas sem ferrão é aquela frequentemente descrita para os demais insetos e artrópodes em geral, sendo a principal diferença, como o nome já diz a ausência de ferrão, ou ferrão atrofiado (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013) (Figura 1.1).

Figura 1.1 – Comparação da morfologia de *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão (Meliponinae).



(a) abelha *Apis mellifera* com descrições morfológicas básicas; (b) estrutura de abelha sem o ferrão e com o saco de veneno; (c) abelha sem o ferrão e sem vesícula de veneno.

Fonte: Oliveira (2015)

No entanto, são observadas diferenças no tamanho entre suas espécies, as quais se apresentam de minúsculas a médias, sendo encontradas algumas espécies até maiores que as abelhas *Apis mellifera*, e também diferenças na cor, enquanto umas abelhas são escuras, outras

têm o tórax alaranjado ou o abdômen com listras amarelas (Figura 1.2) (CARVALHO-ZILSE et al., 2012; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Figura 1.2 – Algumas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae) e sua terminologia popular.



a) Abelha mandaçaia; b) abelha guaraipo; c) abelha tubuna e d) abelha uruçú-amarela.

Fonte: adaptado de Acriapa (2007); Woehl Junior (2010); Caixa... (2013); Oliveira (2015).

Os hábitos de nidificação (construção do ninho) destas abelhas são os mais variados. Frequentemente seus ninhos são construídos em cavidades pré-existent, como ocos de árvores, ninhos abandonados de cupins e formigas e em cavidades no solo. Algumas espécies também constroem seus ninhos expostos ou semiexpostos em galhos de árvores ou fendas em rochas (CARVALHO et al., 2005; VILLAS-BÔAS, 2012; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013). A entrada dos ninhos possui arquitetura e ornamentação característica de cada espécie, auxiliando na identificação e reconhecimento da mesma, sendo esta uma característica marcante (Figura 1.3) (PEREIRA et al., 2012).

Figura 1.3 - Entrada da colmeia de diferentes espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae).

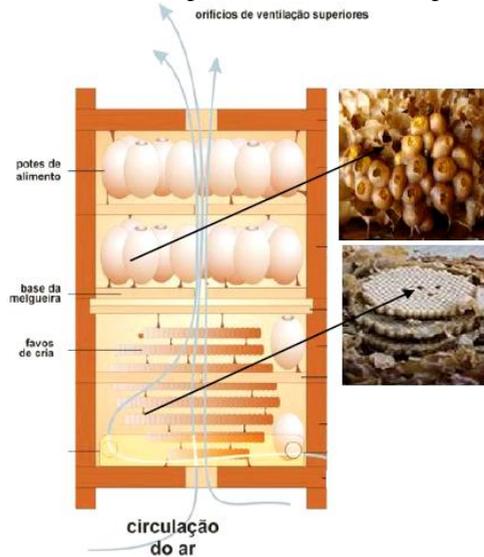


Fonte: Oliveira et al. (2013).

As abelhas sem ferrão apresentam grande diferença na construção de suas colônias quando comparadas às abelhas *Apis mellifera*, pois elas separam as células de cria dos depósitos de alimento (Figura 1.4).

Nas abelhas *Apis mellifera* as células de cria são construídas no sentido vertical, justapostos aos depósitos de alimento, enquanto que nas abelhas sem ferrão são organizados na horizontal. As células de cria são construídas em forma de discos e os depósitos de alimento são armazenados em favos circulares e ovais, apresentando tamanhos variados conforme a espécie.

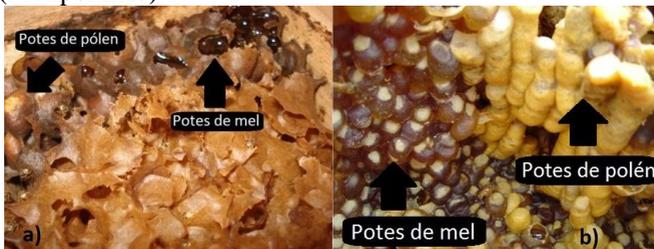
Figura 1.4 – Estrutura física de colmeia de abelhas sem ferrão (Meliponinae) com favos de cria e potes contendo mel e pólen.



Fonte: Venturieri et al. (2007).

Estas abelhas também separam pólen e mel, que são armazenados em dois tipos de potes, diferenciados pelo tamanho, sendo os potes de pólen cilíndricos ou cônicos, com cerca de 3 cm de altura, e os potes de mel ovóides, com aproximadamente 1,5 cm de altura (Figura 1.5) (CARVALHO-ZILSE et al., 2012; PEREIRA et al., 2012).

Figura 1.5 - Potes de mel e pólen de algumas espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae).



a) *Tetragonisca angustula* e b) *Frieseomelitta varia*

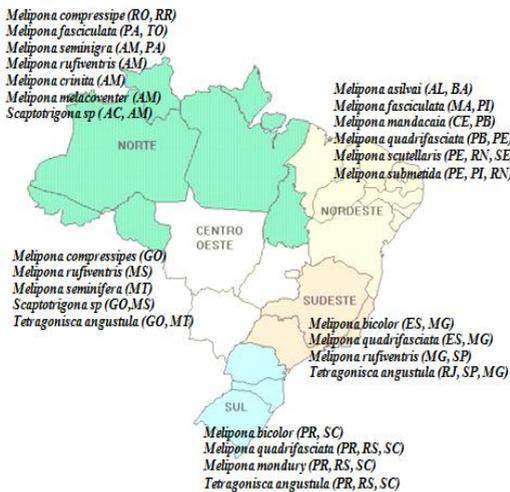
Fonte: Frigieri (2011) e Oliveira (2011).

Além da produção de mel, estas abelhas fabricam: cera, própolis, cerume, geoprópolis, geleia real e pólen. Os materiais utilizados para produção do geoprópolis e da própolis são geralmente coletados na natureza, como o barro e as resinas vegetais. O barro é utilizado por algumas espécies para construção da entrada dos ninhos, mas é principalmente utilizado como constituinte do geoprópolis. O geoprópolis é uma mistura, de consistência dura, composto de barro e própolis, utilizado na vedação de frestas e construção de batumes (proteção da cavidade interna do ninho). Enquanto que a própolis é constituída por resinas coletadas pelas abelhas nas plantas e serve para impermeabilizar e vedar termicamente a entrada dos ninhos. A cera, produzida na própria colônia, é retirada de secreções de glândulas existentes no abdômen de abelhas jovens, utilizada para construção de diversas partes do ninho, como favos de cria. E o cerume é uma mistura da cera branca, pura, com a resina (própolis), sendo utilizada para recobrir discos de cria, manutenção da temperatura da colmeia e também na construção dos potes de alimento e entrada dos ninhos (CARVALHO et al., 2005; CARVALHO-ZILSE et al., 2012, VILLAS-BÔAS, 2012).

No planeta existem cerca de 500 espécies de abelhas sem ferrão, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo a maioria delas encontradas na América do Sul, e uma pequena parcela na Austrália, Ásia e África (NOGUEIRA-NETO, 1997; GUERINI et al., 2009).

Em virtude desta ocorrência típica em regiões tropicais e subtropicais, o Brasil contém a maior biodiversidade de abelhas sem ferrão do planeta, com mais de 300 espécies encontradas, distribuídas em 27 gêneros. Na região amazônica é onde se identifica a maior diversidade destas abelhas, entretanto é observado que nas regiões Norte e Nordeste há maior produção de mel em virtude da criação racional de várias espécies (CARVALHO-ZILSE et al., 2012). Estados como São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul também já estão desenvolvendo uma expressiva criação e produção deste mel (WITTER et al., 2009). Porém dados numéricos concretos de quanto é produzido, inclusive qual região é a que mais produz, ainda não existem, pelo fato principalmente de não haver um cadastro de produtores e tão pouco indústrias processadoras, circunstância esta que pode ser explicada pela falta de uma legislação específica, que regulamente a produção e comercialização do produto. A Figura 1.6 ilustra as principais espécies de abelhas sem ferrão produtoras em cada região do país, segundo estudo realizado por Villas-Bôas (2012).

Figura 1.6 - Principais espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae) produtoras em diferentes regiões do Brasil.



Fonte: Villas-Bôas (2012), adaptado por Biluca (2014).

## 2 MELIPONICULTURA

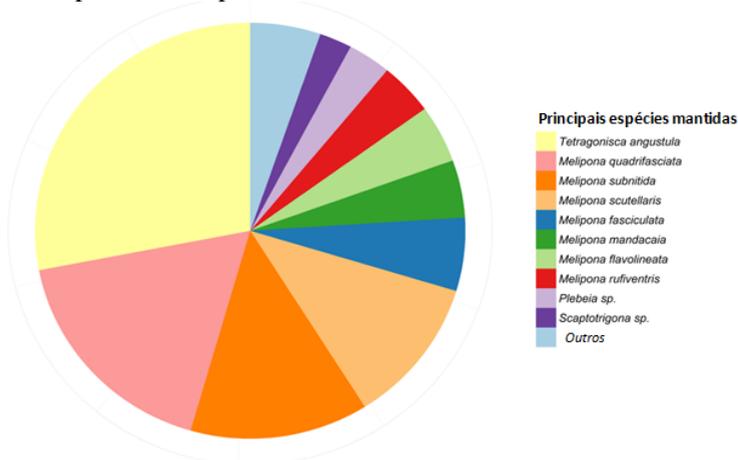
A meliponicultura é o nome atribuído à criação racional das abelhas sem ferrão. Tal atividade vem sendo desenvolvida desde os primórdios das civilizações antigas, no Egito antigo (NOGUEIRA-NETO, 1997; CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006). Na América a criação destas abelhas data com os povos pré-colombianos, desde os Maias no México aos Kayapó e Timbira no Brasil, onde a obtenção dos produtos possuía fins alimentícios, comerciais e religiosos (NOGUEIRA-NETO, 1997; CARVALHO et al., 2005). No Brasil a meliponicultura sempre foi uma prática indígena, mas ao longo do tempo se tornou tradicional para alguns pequenos e médios produtores como uma atividade economicamente viável, de fácil execução e manutenção, podendo ser realizada no meio rural ou urbano, com baixo investimento e mão de obra, exercida como uma fonte de renda complementar (AGUILAR-MONGE, 1999; CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006). Além dos benefícios proporcionados aos produtores, a criação destas abelhas se faz importante também do ponto de vista ecológico, pois ao coletarem pólen e néctar das flores, as abelhas

promovem a polinização e, conseqüentemente, auxiliam na preservação do meio ambiente (SLAA et al., 2006).

A prática de criação das abelhas sem ferrão no Brasil passou por alguns períodos de decréscimo, principalmente quando foram introduzidas no país as abelhas do gênero *Apis*, as quais eram mais produtivas e rentáveis. No entanto, com o incentivo de órgãos do governo federal através de cursos, distribuição de material didático e caixas de criação racional entre agricultores familiares, hoje, a meliponicultura tem sido difundida tanto em nível de espaço, sendo praticada em várias regiões do país, quanto em tecnologia inovadora e investimentos, para uma criação racional mais produtiva, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; JAFFÉ et al., 2015).

Recentemente, Jaffé e colaboradores (2015) apresentaram o primeiro estudo de grande escala, com abordagem quantitativa, o qual teve como objetivo a otimização da meliponicultura brasileira. Através deste estudo foi possível visualizar as principais espécies mantidas por 246 produtores (Figura 1.7), ganhando destaque a *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona subnitida* e *Melipona scutellaris*.

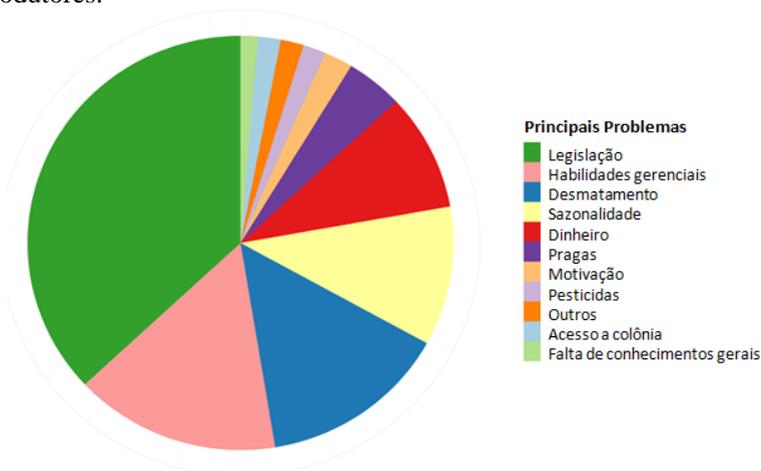
Figura 1.7 – Representação proporcional das principais espécies mantidas por 246 meliponicultores brasileiros.



Fonte: Traduzido de Jaffé et al. (2015)

Os principais problemas enfrentados pelos produtores quanto à criação das abelhas sem ferrão e comercialização dos seus produtos (Figura 1.8), é apontado por mais da metade dos entrevistados como sendo a legislação vigente e as habilidades gerenciais. Além de indicar que, apenas 13% dos entrevistados exploram outros produtos das abelhas sem ferrão, como própolis e pólen.

Figura 1.8 – Representação proporcional dos principais problemas que afetam a meliponicultura no Brasil, conforme identificado por 230 produtores.



Fonte: Traduzido de Jaffé et al. (2015)

Embora, o estudo realizado por Jaffé e colaboradores. (2015) seja de enorme contribuição para o desenvolvimento e otimização da meliponicultura brasileira, os dados coletados no trabalho, em 20 estados, não podem ser considerados como uma representação da população de meliponicultores, pois há cerca de 1.800 produtores registrados em ABENA (Abelhas Nativas), uma rede social hospedada como um grupo Yahoo, no qual administradores do grupo estimam um número ainda maior de produtores (aproximadamente 5.000), visto que muitos vivem em áreas rurais remotas sem acesso a internet e/ou nunca foram registrados por qualquer órgão.

Desta forma, ainda são necessárias maiores informações e especificações, para que o Brasil possa realizar, de forma sustentável, a

utilização destas abelhas, abrindo espaço para um mercado promissor em diversas áreas do país e do mundo (JAFFÉ et al., 2015).

Hoje, a produção do mel de abelhas sem ferrão e sua comercialização ainda são realizadas de maneira informal, isto porque, conforme verificado por Jaffé e colaboradores. (2015), o principal entrave seja a atual legislação, a qual não especifica parâmetros para este produto. Alguns estados brasileiros, no anseio de poder comercializar de forma regular os produtos advindos das abelhas sem ferrão, têm procurado desenvolver normativas ou certificações próprias. No estado da Bahia, por exemplo, foi aprovada em 21 de novembro de 2014, através da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), a Portaria n° 207 que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de abelha social sem ferrão do gênero *Melipona*. Já o estado do Paraná, aprovou no ano de 2012 uma certificação, através do Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIP/POA) da Agência de Desenvolvimento Agropecuário do Paraná (Adapar), para comercialização de méis de abelhas jataí produzidos pela Associação dos Criadores de Abelhas Nativas da APA (área de proteção ambiental) de Guaraqueçaba (Acriapa). Enquanto que, no estado de Santa Catarina, por enquanto somente a criação, comércio e transporte de abelhas sem ferrão são regulamentados, através da Lei n°16.171 de 14 de novembro de 2013.

Em nível nacional, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) publicou a Resolução n° 346, de 16 de agosto de 2004 (BRASIL, 2004), o qual dispõe sobre a utilização de abelhas silvestres e a implementação de meliponários. No entanto, na meliponicultura ainda não há uma padronização a nível nacional de modelos que favoreçam maiores rendimentos e uma qualidade adequada ao consumidor, sendo encontrados desde os mais primitivos, como troncos de árvores, até modelos mais complexos, para observações da dinâmica interna das colônias. Diferentemente da meliponicultura, a criação de abelhas *Apis mellifera* possui o padrão Lasngstroth de colmeia (modelo que proporciona maiores rendimentos na apicultura) (AIDAR, 2010).

### **3 MEL: IDENTIDADE E QUALIDADE, MICROBIOLOGIA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

O mel é definido, segundo a legislação brasileira, como produto de origem animal, produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar

das flores, ou de outras secreções procedentes das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, o qual é coletado, transformado, combinado com outras substâncias específicas, armazenado e maturado no favo (BRASIL, 2000).

Pode ser classificado como mel floral ou de melato. É definido como mel floral aquele obtido do néctar de flores, enquanto que o mel de melato é obtido a partir de secreções das partes vivas das plantas ou excreções de insetos sugadores de plantas. O mel floral também pode ser dividido em unifloral ou monofloral e multifloral ou polifloral, isto porque ele pode ser originário de flores de uma mesma família, gênero e espécie possuindo características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias, ou obtidas de diferentes origens florais (BRASIL, 2000).

Muito apreciado pelo homem, por ser um produto natural, o mel também pode ser definido, como produto viscoso, de sabor agradável, adocicado, sendo boa fonte de energia, com alto valor nutricional e medicinal (DA SILVA et al., 2016). Sua composição média resume-se em dois principais componentes: açúcares e água, destacando-se entre os açúcares a frutose e glicose. No entanto, estudos revelam que uma vasta quantidade de outras substâncias são encontradas no mel, dentre elas proteínas, minerais, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides, ácidos fenólicos, enzimas e pigmentos (CRANE, 1987).

Quanto a microbiologia, o mel geralmente apresenta contagens baixas de micro-organismos, devido as suas características físico-químicas, como pH baixo, baixa umidade e atividade de água, alta concentração de açúcares e viscosidade e pressão osmótica elevada, além da capacidade antimicrobiana, atribuída a presença de agentes antibacterianos como o peróxido de hidrogênio, lisozima, ácidos fenólicos e substâncias voláteis.

Além disso, apresenta expressiva atividade antioxidante, devido principalmente aos compostos fenólicos presentes (ácidos fenólicos e flavonoides) originários das fontes florais em que as abelhas coletam o néctar (SILVA et al., 2013).

### 3.1 Parâmetros de identidade e qualidade

Pelo fato da composição do mel ser muito variável, uma vez que fatores como o néctar da espécie floral visitada pelas abelhas, a condição climática e ambiental e espécie de abelha podem interferir nas propriedades físico-químicas e sensoriais (CRANE, 1987), o Ministério

da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000 estabeleceu padrões de identidade e qualidade do mel, definindo alguns requisitos que servem de padrão, como maturidade (umidade, açúcares redutores, sacarose aparente), pureza (sólidos insolúveis em água, minerais ou cinzas, pólen) e deterioração (acidez livre, atividade diastásica e 5-hidroximetilfurfural) (BRASIL, 2000). Contudo, outros parâmetros, não incluídos na legislação brasileira, como a condutividade elétrica, pH e sólidos solúveis (°Brix) podem auxiliar na garantia da qualidade.

Apesar da atual legislação (BRASIL, 2000) não especificar parâmetros de identidade e qualidade para méis provenientes de diferentes espécies de abelhas, sabe-se que tal instrução normativa foi baseada em normatizações internacionais (*Codex alimentarius* e Mercosul) as quais são específicas para mel de *Apis mellífera*. Portanto, esses parâmetros não são totalmente adequados aos méis de abelhas sem ferrão, já que estudos têm demonstrado diferenças nas características físico-químicas para este tipo de mel, principalmente quanto à umidade, açúcares redutores, acidez, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e atividade diastásica. Alguns autores têm sugerido padrões de identidade e qualidade para este tipo de mel. Vit, Medina e Enríquez (2004) propuseram padrões de qualidade para méis de abelhas sem ferrão da Venezuela, dividindo-os em três grupos: Melipona, Scaptotrigona e Trigona (Tabela 1.1), enquanto que para os méis brasileiros, Villas-Bôas e Malaspina (2005) sugerem padrões para os méis de *Meliponinae* e Carvalho e colaboradores (2013) somente para o gênero Melipona (Tabela 1.2).

Tabela 1.1 – Sugestão de regulamentação para mel de abelhas sem ferrão da Venezuela, comparada com a regulamentação oficial da *Codex Alimentarius Commission* para mel de *Apis mellifera*.

Parâmetros de identidade e qualidade	Codex Alimentarius (2001)			
	<i>Apis mellifera</i>	Melipona	Scatotrigona	Trigona
Umidade (%)	max. 20,0	max. 30,0	max. 30,0	max. 30,0
Açúcares redutores (%)	min. 60,0	min. 50,0	min. 50,0	min. 50,0
Sacarose (%)	max. 5,0	max. 6,0	max. 2,0	max. 6,0
Acidez (mEq kg <sup>-1</sup> )	max. 50,0	max. 70,0	max. 85,0	max. 75,0
Cinzas (%)	-	max. 0,5	max. 0,5	max. 0,5
5-HMF(mg kg <sup>-1</sup> )	max. 40,0	max. 40,0	max. 40,0	max. 40,0
Atividade diastásica (DN)	min. 8,0	min. 3,0	min. 3,0	min. 7,0

5-HMF= hidroximetilfurfural; DN= unidades Göthe.

Fonte: Adaptado de Vit, Medina e Enríquez (2004)

Tabela 1.2 – Sugestão de regulamentação para mel de abelhas sem ferrão do Brasil, comparada a legislação atual brasileira para mel de *Apis mellifera*.

Parâmetros de identidade e qualidade	<i>Apis mellifera</i> (Brasil, 2000)	Meliponinae (Villas-Bôas e Malaspina, 2005)	Melipona (Carvalho et al., 2013)
		Umidade (%)	max. 20,0
Açúcares redutores (%)	min. 65,0	min. 50,0	min. 60,0
Sacarose (%)	max. 6,0	max. 6,0	max. 6,0
Acidez (mEq kg <sup>-1</sup> )	max. 50,0	max. 85,0	max. 50,0
Cinzas (%)	max. 0,6	max. 0,6	max. 0,6
5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	max. 60,0	max. 40,0	max. 10,0
Atividade diastásica (DN)	min. 8,0	min. 3,0	max. 3,0
Sólidos insolúveis (%)	max. 0,1	max. 0,4	max. 0,1

\*máximo permitido para méis desumidificados; 5-HMF= hidroximetilfurfural; DN= unidades Göthe.

Fonte: Villas-Bôas e Malaspina (2005) e Carvalho et al. (2013)

A umidade do mel é uma das características mais importantes, podendo influenciar a viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização e sabor. Por ser a água o segundo maior componente do mel, a fermentação tende a ocorrer mais facilmente, principalmente quando se tem teores elevados de umidade, os quais podem ser influenciados pelo clima, origem floral, colheita, condições de

armazenamento, manejo e região (GUERRINI et al., 2009; DA SILVA et al., 2016). A legislação brasileira e o *Codex Alimentarius* determinam um teor máximo de 20% (m/m) de umidade para méis de *Apis mellifera* (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001).

Para o mel de abelhas sem ferrão, estudos têm mostrado que o mel considerado maduro, apto para a colheita, com adequada manipulação, apresenta teores de umidade acima do máximo estabelecido na legislação brasileira e internacional para mel de *Apis mellifera*. Em méis brasileiros, Almeida-Muradian (2013) ao analisar mel de *Tetragonisca angustula* encontrou valores que variaram de 23,4 a 25,6% (m/m), enquanto que Silva e colaboradores (2013) encontraram valores de 22,2 a 24,4% (m/m) para méis de *Melipona subnitida*. Estudos em outros países também revelam a elevada umidade de méis de abelhas sem ferrão, como mostram os trabalhos de Ferrufino e Vit (2013) com méis da Bolívia (24,1 – 26,5%); Fuernmajor e colaboradores (2013) e Zuluaga-Domínguez e colaboradores (2013) em méis da Colômbia (24,3 – 42,7 e 24,8 – 27,6%, respectivamente); Vit (2013) com méis oriundos da Venezuela (29,7 – 30,2%); Ramón-Sierra, Ruiz-Ruiz e Ortiz-Vázquez (2015) do México (22,8 - 25,0%) e Chuttong e colaboradores (2016) da Tailândia (25,0 – 43,0%).

Teores elevados de umidade podem acelerar o processo de fermentação, resultando na formação de compostos orgânicos indesejáveis, os quais podem conferir gosto amargo, coloração indesejada, interferindo na vida de prateleira do produto e, conseqüentemente, na sua comercialização (DA SILVA et al., 2016).

Os açúcares, principais constituintes do mel (glicose, frutose e sacarose), são determinantes em relação à maturidade e qualidade, conferindo sabor, aroma e viscosidade ao mel (KAMAL; KLEIN, 2011). Na legislação brasileira, o mel é considerado maduro quando atinge teores mínimos de açúcares redutores de 65% (m/m) (BRASIL, 2000). Contudo, para o padrão do *Codex Alimentarius*, o valor mínimo de açúcares redutores é 60% (m/m) (CODEX STAN 12, 2001). No entanto, os méis de abelhas sem ferrão podem apresentar grande variação no conteúdo de açúcares redutores, com valores muitas vezes inferiores aos exigidos pelas legislações específicas para mel de *Apis mellifera*.

Estudos com méis brasileiros de *Tetragonisca angustula* e *Melipona subnitida*, realizados por Almeida-Muradian (2013) e Silva e colaboradores (2013), apresentaram, em algumas amostras, valores inferiores a 65% (m/m) e 60% (m/m), conforme o recomendado pelas

legislações para méis de *Apis mellífera*, sendo encontrados teores mínimos de 44,78 e 50,50% (m/m), respectivamente. Assim como em outros países, estudos realizados por Dardon, Maldonado-Aguilera e Enriquez (2013), Ferrufino e Vit (2013), Fuenmajor e colaboradores (2013) e Ramón-Sierra, Ruiz-Ruiz e Ortiz-Vázquez (2015) em méis de abelhas sem ferrão provenientes da Guatemala, Bolívia, Colômbia e México respectivamente, os valores mínimos observados variaram de 29,7 a 58,6% (m/m).

Os demais açúcares presentes nos méis são principalmente dissacarídeos, como a sacarose, estabelecido como máximo de 6% (m/m) para mel floral pela legislação brasileira e máximo de 5% (m/m) pelo *Codex Alimentarius* (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001). Para méis de abelhas sem ferrão tais valores podem variar, dependendo da espécie, florada e origem. Desta forma, por exemplo, teores entre 0,20% (m/m) e 10,20% (m/m) podem ser encontrados, conforme mostram os estudos realizados por Souza e colaboradores (2009) e Sousa e colaboradores (2013).

A acidez no mel é proveniente da presença de ácidos orgânicos em equilíbrio com as suas lactonas ou ésteres internos e alguns íons inorgânicos, tais como fosfatos, cloretos e sulfatos (MOREIRA et al., 2010). Pode ser influenciada por enzimas das glândulas mandibulares das abelhas, diferentes fontes de néctar e por minerais presentes no mel (ALVES et al., 2013). Constitui-se como um importante parâmetro indicativo da deterioração do mel, revelando a ocorrência de fermentação dos açúcares, pela ação das leveduras, quando valores elevados são observados (DA SILVA et al., 2016). Desta forma, a legislação brasileira e o *Codex Alimentarius* preconizam teor máximo de acidez de 50 mEq kg<sup>-1</sup> para méis de *Apis mellífera* (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001). Méis de abelhas sem ferrão apresentam teores de acidez extremamente variáveis, como se pode observar em estudos realizados por Almeida-Muradian (2013) e Silva e colaboradores (2013) em méis brasileiros, os quais encontraram valores entre 21,65 e 63,84 mEq kg<sup>-1</sup>, assim como Dardon, Maldonado-Aguilera e Enriquez (2013) e Fuenmajor e colaboradores (2013) que obtiveram resultados entre 4,95 e 85,53 mEq kg<sup>-1</sup> para méis de abelhas sem ferrão de outros países.

O 5-HMF também é considerado como um indicativo de deterioração do mel, pois é formado pela decomposição de monossacarídeos ou pela *reação de Maillard*, quando o mel é aquecido ou armazenado durante um tempo prolongado, ou ainda, por adição

fraudulenta de açúcares invertidos. Desta forma, elevados teores de 5-HMF podem caracterizar más condições de armazenamento ou adulteração (DA SILVA et al., 2016). Buscando a garantia da qualidade do mel, a legislação brasileira estabelece limite máximo para méis de *Apis mellifera* de 60 mg kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000). O Codex Alimentarius estabelece como valor máximo 40,00 mg kg<sup>-1</sup> para o mel processado ou mistura de méis e um valor máximo de 80,00 mg kg<sup>-1</sup> se o mel e as misturas desses méis apresentar origem declarada de regiões de clima tropical (CODEX STAN 12, 2001). Para méis de abelhas sem ferrão os valores observados na literatura indicam semelhança aos reportados para méis de *Apis mellifera*. No entanto, alguns estudos têm revelado baixos teores de 5-HMF nestes méis, fato este que pode ser atribuído a sua elevada atividade de água (Aa) e acidez, que acarreta na diminuição da velocidade da *reação de Maillard*, inibindo a formação de 5-HMF, além de terem açúcar predominante a frutose. Sabe-se que elevados teores de glicose, aumentam a velocidade da *reação de Maillard*, resultando assim, na formação de 5-HMF (BILUCA et al., 2014).

As diastases ( $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases) são enzimas naturalmente presentes no mel. Por serem sensíveis ao calor (termoláveis) são consideradas indicadoras de superaquecimento e grau de conservação do produto (AHMED et al., 2013). A atividade diastásica corresponde à atividade da enzima presente em 1 g de mel, que pode hidrolisar 0,01 g de amido em 1 h a 40°C, expressa como o número de diastase em unidades (un.) Göthe (AHMED et al., 2013). Em virtude disso, a legislação brasileira e o *Codex alimentarius* determinam que méis de *Apis mellifera* devam apresentar atividade diastásica acima de 8 unidades na escala Göthe. Porém, méis com baixo conteúdo enzimático natural, podem apresentar no mínimo 3 un. Göthe, desde que o conteúdo de 5-HMF não exceda a 15 mg kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001). Em méis de abelhas sem ferrão, a atividade diastásica observada pode encontrar-se muitas vezes abaixo de 3 un. Göthe, conforme pode ser verificado em estudos realizados por Guerrini e colaboradores (2009), Almeida-Muradian (2013), Dardon, Maldonado-Aguilera e Enriquez (2013), Fuenmajor e colaboradores (2013) e Chutong e colaboradores (2016) apresentando valores entre 0,15 a 22,25 un. Göthe.

As grandes diferenças encontradas entre os estudos com méis de abelhas sem ferrão é devido a grande diversidade de espécies, com especificidades comportamentais e preferências, que conseqüentemente, refletem em um mel com características bem peculiares, além da

localidade em que o mel foi coletado ser diferente, clima, solo, florada. Enfim, muitas são as variáveis que determinam as características físico-químicas deste mel. Em virtude disso há um grande desafio, por parte de pesquisadores e órgãos reguladores na definição dos parâmetros a serem seguidos, isto porque poucos são os estudos que analisaram quantidades representativas de amostra de mel de uma mesma espécie, ou então faltam informações, de suma importância para a caracterização, como: localidade geográfica de coleta, origem botânica ou tipo de florada utilizada pelas abelhas, além da grande diversidade de abelhas sem ferrão existentes (CARVALHO et al., 2013).

### 3.2 Microbiologia

O desenvolvimento microbiano no mel é evitado devido a alguns fatores, como pH baixo, reduzido teor de umidade e Aa, viscosidade elevada e alta concentração de açúcares e pressão osmótica (MARTINS; MARTINS; BERNARDO, 2003). No caso do mel de abelhas sem ferrão, por apresentar teores de umidade e Aa mais elevada, aumenta a propensão de desenvolvimento de micro-organismos (FRANCO; LANDGRAF, 2008; DE SOUSA et al., 2016). No entanto, as demais propriedades intrínsecas juntamente com a presença de agentes antibacterianos como o peróxido de hidrogênio, lisozima, ácidos fenólicos e substâncias voláteis, atribuem certa capacidade antimicrobiana, sendo capaz de inibir ou até mesmo destruir a maior parte dos micro-organismos existentes no mel (BASUALDO et al., 2007). Desta forma, espera-se que o mel contenha contagens baixas e variedade limitada de micro-organismos, sendo possível dizer que altas contagens sejam procedentes de contaminações recentes (ALMEIDA-ANACLETO, 2009).

As possíveis contaminações que podem ocorrer no mel são divididas em dois grupos, primária e secundária. As contaminações primárias são aquelas inerentes ao mel, e difíceis de controlar, como pólen, trato digestivo das abelhas, poeira, ar e flores (SNOWDON; CLIVER, 1996; ANANIAS; MELO; MOURA, 2013). Neste tipo de contaminação encontram-se os bolores e leveduras, que em condições normais de umidade, não interferem na qualidade do mel e não são patógenos (ALMEIDA-ANACLETO, 2007; MENDES et al., 2009). Já as contaminações secundárias estão diretamente relacionadas à extração e beneficiamento, sendo estas contaminações possivelmente iguais a de

outros alimentos, uma vez que envolvem manipuladores, equipamentos, recipientes, insetos e outros animais (MENDES et al., 2009; ANANIAS; MELO; MOURA, 2013).

São indicativos de contaminação secundária, principalmente no que diz respeito à higiene associada à manipulação a contaminação por coliformes. Porém tais contaminações podem facilmente ser controladas com a implementação de boas práticas de fabricação (ANANIAS; MELO; MOURA, 2013).

A legislação brasileira (Instrução Normativa nº 11/2000) (BRASIL, 2000), do Mercosul (Resolução nº56/1999) (MERCOSUL, 1999) e internacional (Codex Stan nº12/1981) (CODEX STAN 12, 2001) específicas para o mel não exigem a realização de análises microbiológicas, referindo-se somente que as práticas de manipulação e beneficiamento devem seguir as boas práticas de fabricação. Entretanto, algumas análises microbiológicas, tais como contagem de coliformes, bolores e leveduras podem servir como base ao estudo da qualidade microbiológica do mel (ALMEIDA-ANACLETO, 2007).

As contagens de coliformes ou enterobactérias são indicadores de práticas sanitárias de higiene, podendo ser visualizadas através destas análises condições inadequadas durante o processamento, produção e armazenamento (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Quanto às bactérias patogênicas, não há relatos no mel de crescimento de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* spp., sendo suas análises dispensadas (SNOWDON; CLIVER, 1996).

Os bolores e leveduras são regularmente encontrados no mel, pois têm origem ambiental e são disseminados pelo vento. A contagem de bolores e leveduras indica a qualidade e condição do mel, vida útil do produto e potencial de degradação, isto porque sua presença no mel está relacionada à fermentação, que resulta do consumo de açúcares pelas leveduras, com produção de subprodutos que alteram o paladar e aroma final (ALMEIDA-ANACLETO, 2007; MENDES et al., 2009). No mel, as leveduras constituem o principal problema, pois podem crescer em ambiente ácido e com pouca água e não são inibidas pela sacarose (SNOWDON; CLIVER, 1996).

### 3.3 Atividade antioxidante

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal, pois são produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas (ZHONG, 2011). Os vegetais possuem dois tipos

de metabólitos: primários e secundários. Os primários correspondem à sobrevivência do vegetal, com função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes, enquanto que os metabólitos secundários respondem às condições ambientais a qual o vegetal está associado e à estratégia de defesa das plantas, então a partir desse metabolismo são produzidos os metabólitos secundários – terpenos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (ERB et al., 2013). Devido à função destes metabólitos de proteger as plantas contra estresses biológicos e ambientais, são conferidos a estes compostos atividade antioxidante, atuando como inibidores de radicais livres (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012; ZALUSKI; CARPENTER; JANE CZKO, 2015).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são radicais que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. São formados a partir do processo respiratório e em diversas reações oxidativas que ocorrem nas células aeróbias. Tal configuração faz destas moléculas altamente instáveis e quimicamente muito reativas, capazes de reagir com qualquer composto próximo a sua órbita externa, exercendo função oxidante ou redutora (KEHRER; ROBERTSON; SMITH, 2010; LUSHCHAK, 2014). A presença destes radicais livres em excesso no organismo pode acarretar lesões em componentes celulares, oxidação de lipídeos, proteínas, açúcares e ácidos desoxirribonucleicos (DNA) e ribonucleicos (RNA), o que contribui para o desenvolvimento de doenças como Parkinson, Alzheimer, câncer, cardiovasculares, distúrbios gastrointestinais, envelhecimento, entre outros (GÖRLACH, et al., 2015).

Os radicais livres são naturalmente produzidos pelo metabolismo dos seres vivos e por isso as células apresentam certa capacidade antioxidante a fim de proteger nosso corpo contra os efeitos prejudiciais destes radicais. Isto ocorre através dos tecidos, os quais dispõem de um sistema antioxidante integrado com um arranjo de diversos componentes lipossolúveis (vitamina E; carotenoides), hidrossolúveis (ácido ascórbico; glutatinoxidase) e enzimáticos (glutatinoxidase; superóxido dismutase; catalase) (BIRBEN et al., 2012). No entanto, a capacidade é limitada para anular a atividade destes compostos e a ingestão de antioxidantes, pela dieta alimentar pode melhorar a função fisiológica, reduzindo os radicais livres, inibindo ou retardando a oxidação (BAGHIANI et al., 2011; MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016).

Os antioxidantes são encontrados na maioria dos alimentos vegetais, desta forma, a inclusão destes alimentos em uma dieta equilibrada pode combater o excesso de radicais livres e como consequência prevenir diversas doenças (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016). A relação da alta ingestão de produtos vegetais na dieta com a redução no risco de doenças tem sido estudada nos últimos anos e os bons resultados observados são atribuídos diretamente aos compostos que possuem atividade antioxidante (ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, estilbenos, cumarinas e taninos) (DEL RIO et al., 2013). Os principais antioxidantes encontrados nos vegetais são as vitaminas C e E, carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente flavonoides (GRANATO; ALEZANDRO; NAZZARO, 2015).

Dentre todas as substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos são os mais estudados, visto que conseguem inibir a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*, além de estarem relacionados, segundo estudos, ao efeito da prevenção de diversas doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (DEL RIO et al., 2013; GRANATO; ALEZANDRO; NAZZARO, 2015). Tal capacidade antioxidante está ligada principalmente as suas propriedades redutoras e estrutura química, características estas essenciais na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição (ZHOU et al., 2012).

A expressiva atividade antioxidante no mel é atribuída pelos compostos fenólicos presentes (ácidos fenólicos e flavonoides). Isto se deve ao fato de que as abelhas ao coletarem o néctar produzido pelas plantas transferem os compostos bioativos produzidos pelas plantas para o mel (DA SILVA et al., 2016). No entanto, a capacidade antioxidante pode ser relacionada e determinada em função da quantidade destes compostos quando presentes no mel, os quais são influenciados por uma série de fatores, como a origem floral e geográfica, o processamento, manipulação e armazenamento, além da espécie de abelha (SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010).

Estudos tem mostrado que a origem floral tem a maior influência sobre esta atividade, enquanto que processamento, manipulação e armazenamento afetam em menores proporções (GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002; WANG; GHELDOLF; ENGESETH, 2004; TURKMEN et al., 2005). Além de que outros estudos correlacionam à capacidade antioxidante e a cor do mel, mostrando que o mel de cor mais escura apresenta maior conteúdo de fenólicos totais e,

consequentemente, maior capacidade antioxidante (TURKMEN et al., 2005; BERTONCELJ et al., 2007).

## **4 COMPONENTES INERENTES AO MEL E SUA ESTABILIDADE**

Quando se trata de alimentos, estabilidade é um termo muito relativo, já que a degradação é um processo contínuo e inevitável. A degradação de alimentos caracteriza-se por diversos tipos de alterações (microbiológicas, químicas ou físicas), que resultam em perda progressiva na qualidade de um produto. No entanto, a taxa de degradação de determinado alimento pode ser controlada, desde que sejam conhecidos os tipos de alterações às quais o produto está mais suscetível e os mecanismos destas alterações (FELLOWS, 2006; AZEREDO, 2012).

O mel, por ser um alimento compostos por uma vasta gama de substâncias (proteínas (enzimas), ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, pigmentos, compostos fenólicos), além dos açúcares e a água, espera-se que ocorram variações na sua composição durante o período de armazenamento ou quando submetido a algum tipo de processamento (CRANE, 1987; DA SILVA et al., 2016). Dentre os principais fatores que afetam a estabilidade do mel, destacam-se: crescimento de micro-organismos, elevada umidade, aumento de temperatura e aumento da acidez, o que pode resultar em alterações de pH e formação de possíveis compostos químicos, de forma a ocorrer sabores e odores indesejáveis, além da alteração na composição dos constituintes do mel (DA SILVA et al., 2016).

Algumas mudanças podem ser positivas ou negativas, alterando as características nutricionais e sensoriais. Um melhor conhecimento sobre as mudanças que podem ocorrer em amostras de mel de abelhas sem ferrão após processamento ou armazenamento pode ser útil para o desenvolvimento de mecanismos que garantam o frescor original desse tipo de alimento.

### **4.1 Umidade**

O conteúdo de umidade no mel é uma das características mais importantes, pois influencia nas suas propriedades físicas, como viscosidade e cristalização e também em outros parâmetros, tais como cor, sabor, gosto, solubilidade e conservação (ESCUREDO et al., 2013).

Tal conteúdo pode variar em regiões com umidade relativa alta, ou em função da estação do ano; sendo mais provável o processo de fermentação do mel na estação chuvosa do que na estação de seca. Outros fatores que pode ocasionar um aumento no conteúdo de umidade no mel são as operações de processamento do produto, bem como em condições inadequadas de armazenamento, pois o mel é higroscópico e absorve a umidade do ambiente (KARABAGIAS et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015).

A taxa de cristalização que ocorre no mel depende da razão entre a glicose e a umidade (G/U). Dobre e colaboradores (2012) indicam uma cristalização lenta no mel quando a razão G/U é inferior a 1,7 e quando a proporção é superior a 2,0, a cristalização é rápida e completa (ESCUREDO et al., 2014). A cristalização acarreta na diminuição dos sólidos solúveis resultando na diluição da solução amorfa e, em consequência, aumento da Aa. Valores de Aa acima de 0,60 representam o limiar crítico para a estabilidade microbiana. Essa informação é de grande importância, pois os méis contém leveduras osmofílicas, que podem causar a fermentação, formação de álcool etílico e dióxido de carbono (VENIR; SPAZIANI; MALTINI, 2010; ESCUREDO et al., 2013; TORNUK et al., 2013).

#### 4.2 Açúcares

Os açúcares representam a maior parte da composição do mel, destes 75% monossacarídeos (glicose e frutose), 10-15% de dissacarídeos (sacarose, maltose, furanose, isomaltose, matulose, trealose, nigerose e kojibiose), além de pequenas quantidades de outros açúcares (maltotriose e melezitose). São os açúcares que conferem ao mel viscosidade, higroscopicidade, granulação, e também valor energético (OUCHEMOUKH et al., 2010; DA SILVA et al., 2016). Sua composição é variável, dependendo principalmente da origem botânica visitada pelas abelhas e origem geográfica (ESCUREDO et al., 2014). Desta maneira, a concentração de frutose e glicose pode ser indicador útil para a classificação dos méis monoflorais, assim como a proporção destes compostos para tendência a cristalização, isso porque frações maiores de glicose em relação à frutose podem representar uma cristalização mais rápida devido a menor solubilidade da glicose em água em relação à frutose (ESCUREDO et al., 2014; DA SILVA et al., 2016).

O aquecimento ou armazenamento prolongado podem modificar a composição de açúcares. Isto acontece pelo fato das pentoses e as hexoses sofrerem decomposição, em uma lenta enolização e uma rápida  $\beta$ -eliminação de três moléculas de água, o que acarreta na formação de compostos indesejáveis, como os furanos (CHERNETSOVA; MORLOCK, 2012). Dentre os principais furanos formados tem-se o furfural que é proveniente de pentoses, e o 5-HMF, proveniente de hexoses como a glicose e a frutose (MOREIRA et al., 2010). Tais produtos de degradação dos açúcares geralmente estão relacionados com reações de escurecimento não enzimáticas (reações do tipo *Maillard*), degradação do açúcar em meio ácido e caramelização (DA SILVA et al., 2016).

Além destes compostos, outros produtos podem ser formados a partir da degradação dos açúcares em presença de aminoácidos, quando submetidos ao aquecimento, tais como 2-acetilfurano (WANG et al., 2009), isolmaltol (OTA; KOHMURA; KAWAGUCHI, 2006), 3,5-diidroxil-2-metil-5,6-diidropiran-4-ona e maltol (JELEN, 2011), modificando cor, sabor e odor do mel.

#### 4.3 Acidez livre e pH

A acidez livre e o pH são importantes parâmetros relacionados à deterioração do mel. O pH baixo, característico do mel, corrobora na inibição do crescimento de micro-organismos, uma vez que o pH ótimo para a maioria dos micro-organismos situa-se entre 7,2 e 7,4. A acidez livre caracteriza-se pela presença de ácidos orgânicos, em equilíbrio com as suas lactonas, ou ésteres internos e alguns íons inorgânicos (GOMES et al., 2010; ALVES et al., 2013). Desta forma, valores elevados de acidez podem ser indicativos de fermentação dos açúcares em ácidos orgânicos, uma vez que os ácidos levulínico e fórmico, que estão presentes no mel, podem ser originados a partir do 5-HMF que, em reações sucessivas, une-se a duas moléculas de água, produzindo uma molécula de ácido levulínico e outra de ácido fórmico, elevando o teor de acidez livre do mel (DA SILVA et al., 2016).

#### 4.4 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica do mel está associada com o teor de cinzas (conteúdo mineral) e acidez, revelando a presença de íons, ácidos orgânicos e proteínas (YÜCEL; SULTANOĞLU, 2013b). É muito

utilizada como indicador de qualidade do mel, pois auxilia na identificação e distinção de méis florais e de melato (LAZAREVIĆ et al., 2012; KARABAGIAS et al., 2014). Quanto a sua estabilidade, os elementos minerais, ao contrário dos demais compostos químicos do mel, não estão sujeitos à degradação por exposição ao calor, luz e agentes oxidantes, pHs extremos ou outros fatores que podem afetar nutrientes orgânicos. Em sua essência, os sais minerais são indestrutíveis (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

#### 4.5 5-Hidroximetilfurfural

Formado pela decomposição de monossacarídeos ou pela *reação de Maillard* quando o mel é aquecido ou armazenado durante um tempo prolongado, o conteúdo de 5-HMF é utilizado como indicativo de deterioração do mel. Além do mais, sua concentração tende a aumentar significativamente à medida que a temperatura do tratamento térmico e o tempo de armazenamento aumentam. Porém, somente o 5-HMF não pode ser utilizado como parâmetro na avaliação da severidade do tratamento térmico, pois outros fatores, como o perfil de açúcares, a presença de ácidos orgânicos, o pH, o teor de umidade, a Aa e a fonte floral podem influenciar nos níveis. Além do mais, o 5-HMF também pode se formar em baixas temperaturas, mesmo em condições ácidas, por desidratação dos açúcares em reações subsequentes. Onde o composto *3-deoxyosone*, composto chave na formação do 5-HMF, provém da 1,2 enolização e desidratação da glicose ou da frutose. A desidratação adicional e a ciclização de *3-deoxyosone* acarretam no aumento do conteúdo de 5-HMF. Desta forma, o teor de 5-HMF fornece apenas uma indicação de superaquecimento ou más condições de armazenamento (CAPUANO; FOGLIANO, 2011; CHERNETSOVA; MORLOCK, 2012; TORNUK et al., 2013).

Em méis de abelhas sem ferrão, conforme já mencionado, Biluca et al. (2014) sugerem uma possível resistência deste mel à formação de 5-HMF após aplicação de tratamento térmico, possivelmente devido as suas características particulares, como o predomínio de frutose e baixas concentrações de glicose, elevada Aa e acidez. Sabe-se que quando se tem elevados conteúdos de glicose a velocidade da *reação de Maillard* aumenta, resultando assim, em níveis mais elevados de 5-HMF. E quando a Aa e acidez são elevadas, estas reduzem a velocidade da *reação de Maillard* e conseqüentemente a formação de 5-HMF é inibida

(RIBEIRO; SERAVALLI, 2007; DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010).

#### 4.6 Diastases

As diastases ( $\alpha$ - e  $\beta$ - amilases) são enzimas naturalmente presentes no mel, que tem por função digerir a molécula de amido em uma mistura de maltose (dissacarídeo) e maltotriose (trissacarídeo) (PONTARA et al., 2012; AHMED et al., 2013). São sensíveis ao calor (termoláveis) e por isso são consideradas indicadoras de superaquecimento e grau de conservação do produto, uma vez que podem ser reduzidas quando o produto é submetido ao aquecimento acima de 60°C, bem como deteriorar-se mesmo em temperatura ambiente quando o armazenamento for prolongado (YÜCEL; SULTANOĞLU, 2013b; DA SILVA et al., 2016).

#### 4.7 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo quimicamente heterogêneo, os quais possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas em suas estruturas, podendo variar desde uma molécula fenólica simples a um polímero complexo, de elevada massa molar. São conhecidos aproximadamente 10.000 compostos, os quais são agrupados em diferentes classes de acordo com sua estrutura química básica: não flavonoides (ácidos fenólicos) e flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonais, flavanóis, antocianidina, isoflavonas e chalconas) (ARAÚJO, 2011; MURKOVIC, 2016).

Na classe dos não flavonoides encontram-se os ácidos fenólicos. Os ácidos fenólicos apresentam funções bioativas, atuando principalmente como antioxidantes, eliminando radicais livres e inibindo a oxidação lipídica. São divididos em dois subgrupos de acordo com sua estrutura: ácidos hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos (ARAÚJO, 2011; MARTINS et al., 2011). No subgrupo dos ácidos hidroxibenzoicos derivam os ácidos:  $p$ -hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, salicílico (2-hidroxibenzoato), gálico e elágico, os quais podem ser encontrados nas células na forma solúvel, conjugado com açúcares ou ácidos orgânicos, ou constituindo a parede celular juntamente com ligninas (ARAÚJO, 2011; MURKOVIC, 2016). E os ácidos hidroxicinâmicos, que ocorrem geralmente na sua forma conjugada como ésteres de hidroxiácidos e também na forma pura,

sendo diferenciados pelos substituintes do anel, originando  $\rho$ -cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (ARAÚJO, 2011).

Já a classe dos flavonoides compõem o maior grupo de compostos fenólicos das plantas, sendo largamente distribuídos nas sementes, cascas, folhas e flores. Estes compostos são responsáveis pela proteção contra a radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros das plantas. E pelo fato das plantas possuírem vários derivados polifenólicos com alta diversidade estrutural e complexidade, é provável que quando as abelhas recolhem o néctar, estes compostos bioativos são transferidos das plantas para o mel (SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010).

Os compostos fenólicos têm sido recentemente sugeridos como possíveis marcadores para determinação da origem botânica do mel, além do grande interesse no estudo da atividade antioxidante, devido à sua capacidade de reduzir ou sequestrar a formação de radicais livres (ESCRICHE et al., 2011; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012).

No mel os principais componentes funcionais são os flavonoides, e sua capacidade antioxidante dependerá da fonte floral utilizada pelas abelhas para coletar o néctar, além de fatores ambientais e sazonais. Porém, os compostos fenólicos, assim como os demais compostos do mel sofrem degradação dependendo das condições ambientais os quais são submetidos (ESCRICHE et al., 2011; BIESAGA; PYRZYNSKA, 2013; ESCRICHE et al., 2014).

Escriche et al. (2014) avaliaram o impacto do tratamento térmico industrial em compostos fenólicos de méis de *Apis mellifera* espanhóis. Observaram uma diminuição significativa na concentração de galangina, kaempferol, miricetina e ácido  $\beta$ -cumárico após o tratamento térmico, sendo mais relevante para a miricetina após a pasteurização. Já Truchado et al. (2008) avaliaram a estabilidade de flavonoides glicosilados em mel de *Apis mellifera* e concluíram que a característica estrutural comum entre os flavonoides *kaempferol-7-O-robinoside*, *kaempferol-7-O-rhamnoside* e *kaempferol-7-O-rhamnosyl (1→2)rhamnosyl (1→2) hexosyl (1→2)rhamnoside* é a presença de um grupo hidroxilo livre na posição 3. Isto confere certa instabilidade a estes compostos sob condições alcalinas brandas e elevada sensibilidade à oxidação na presença de agentes oxidantes suaves, tais como peróxido de hidrogênio, que está presente no mel, sendo responsável pela degradação verificada nos flavonoides.

## 5 TÉCNICAS DE CONSERVAÇÃO DO MEL

Pelo fato do mel de abelhas sem ferrão apresentar características físico-químicas distintas do mel de *Apis mellifera* e com isso reduzida vida de prateleira, conforme já mencionado, processos tecnológicos que garantam sua qualidade pelo máximo de tempo possível deverão ser implementados no seu beneficiamento, mas desde que estes não modifiquem suas características próprias (VILLAS-BÔAS, 2012; CARVALHO et al., 2013).

Atualmente, algumas opções têm sido levantadas por pesquisadores, entre elas a possibilidade de se ter tratamento térmico, refrigeração, ou ainda desumidificação (CARVALHO et al., 2013). Carvalho e colaboradores (2013) sugerem um modelo de beneficiamento para o mel de abelhas sem ferrão, com as etapas a serem seguidas, recomendando a utilização da refrigeração e/ou desumidificação.

A refrigeração é o método mais utilizado para retardar processos de degradação de produtos, pois dificulta o crescimento de micro-organismos (VILLAS-BÔAS, 2012). No entanto, no caso do mel de abelhas sem ferrão, apesar de ser eficaz, conseguindo diminuir a proliferação de leveduras e bactérias, além de retardar a fermentação, em escala industrial torna-se dificultoso uma vez que o produtor deverá refrigerar o mel após a colheita, transportá-lo refrigerado e comercializá-lo também sob refrigeração. O uso da refrigeração pode ser viável, mas dependerá da escala de produção e um plano de negócio minucioso o qual garanta lucros nas vendas (VILLAS-BÔAS, 2012).

Desumidificação ou desidratação é o processo de retirada ou redução dos teores de água de um determinado produto. A água é um dos constituintes determinante para o crescimento microbiano, sua redução/retirada evita que sejam criadas condições de desenvolvimento de micro-organismos (VILLAS-BÔAS, 2012). O mel de abelhas sem ferrão apresenta teores de umidade variando de 25 a 35%. Como alternativa para melhorar a conservação, aumentando o tempo de vida de prateleira existe a recomendação da redução de umidade a níveis iguais ou inferiores a 20%. Há duas formas de realizar a desumidificação: máquina de desumidificação e sala desumidificação. Apesar de o segundo método ser de baixo custo, ambos os sistemas possuem a desvantagem de não garantir as características naturais do mel, como viscosidade e doçura (ALVES et al., 2007; VILLAS-BÔAS, 2012).

Outra desvantagem deste método consiste em que ao retirar ou reduzir o conteúdo de água do mel de abelhas sem ferrão, conseqüentemente haverá uma diminuição da Aa e como já visualizado em trabalho realizado por Biluca e colaboradores (2014) a Aa elevada neste tipo de mel pode auxiliar em baixos teores de 5-HMF, ou seja, está associado a uma possível resistência a formação de 5-HMF quando são aplicados tratamentos térmicos, conforme já mencionado.

### 5.1 Tratamento térmico

O tratamento térmico visa principalmente à eliminação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos não esporulados e/ou enzimas indesejáveis ao produto. No entanto, tem como objetivo secundário o aumento da vida de prateleira, com redução mínima das características nutricionais e sensoriais (FELLOWS, 2006). Com relação ao mel, o tratamento térmico além de inibir os micro-organismos, em méis de *Apis mellifera* também é utilizado para retardar a cristalização e facilitar o envase devido à diminuição da viscosidade. Porém, a ação do calor sobre o mel pode provocar alterações e destruição de componentes sensíveis ao calor, como degradação de vitaminas e proteínas, alterações na cor, escurecimento, formação de 5-HMF e inativação enzimática (SUBRAMANIAN; UMESH HEBBAR; RASTOGI, 2007). Contudo, segundo Souza e Silveira (1987) tais danos advindos do aquecimento podem ser reduzidos quando o tratamento térmico é controlado em termos de duração e quantidade de calor utilizado.

Muitos estudos têm sido realizados nos últimos anos com o intuito de verificar as conseqüências do tratamento térmico nas características físico-químicas do mel de *Apis mellifera*, principalmente aquelas relacionadas diretamente com a qualidade, como teor de 5-HMF, alteração de cor, além dos teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose), compostos fenólicos e atividade antioxidante (TOSI et al., 2004; TURKMEN et al., 2005; TURHAN et al., 2008; ESCRICHE et al., 2009; KOWALSKI, 2013; BILUCA et al., 2014; ESCRICHE et al., 2014).

A legislação brasileira através da Portaria nº6 de 25 de julho de 1985 do MAPA traz as “Normas Higiênico-Sanitárias e Tecnológicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados” (BRASIL, 1985), a qual recomenda a utilização de gradientes térmicos. No entanto, tais tratamentos recomendados ainda não foram avaliados quanto ao seu efeito sobre o mel, tanto de *Apis mellifera* quanto de abelhas sem ferrão,

fazendo-se necessário seu estudo, além da busca por outros processos efetivos e economicamente viáveis para que a aplicação possa também ser realizada em pequena escala.

Em méis de abelhas sem ferrão, devido ao pH baixo e elevada Aa, condições estas favoráveis ao desenvolvimento de leveduras causadoras de fermentação, o tratamento térmico deve primar pela eliminação deste micro-organismos. Para isto, a utilização de temperaturas elevadas com rápido tempo poderia ser utilizada, uma vez que Tosi e colaboradores (2004) verificaram inibição no desenvolvimento de fungos em méis de *Apis mellifera* após aquecimento de 80°C por 60s, além de observarem nestas mesmas condições diminuição da tendência a cristalização e poucos efeitos prejudiciais sobre a qualidade do mel.

Neste contexto, a busca por processos térmicos ideais que minimizem os prejuízos à composição química e estendam a vida de prateleira do produto, prevenindo a fermentação e cristalização durante o armazenamento constitui-se em uma necessidade para os méis de abelhas sem ferrão.

## 6 TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS

As técnicas analíticas instrumentais tem ganhado destaque, nos últimos anos, pelos avanços tecnológicos, tanto de sistemas analíticos mais robustos e de menor tamanho, quanto no desenvolvimento de softwares de operação e tratamento de dados que otimizam o tempo de análise e interpretação dos resultados obtidos (HARVEY, 2000). Dentre as técnicas de análise química instrumental podem-se citar três principais grandes áreas: Cromatografia, Eletroforese e Espectroscopia, as quais são caracterizadas por suas particularidades e analitos de interesse possíveis de detecção e/ou quantificação (DEAN, 2003).

Para análise dos compostos presentes no mel, as técnicas analíticas modernas empregadas utilizam-se de instrumentos que permitem alta sensibilidade, velocidade e elevada frequência analítica (SKOOG et al., 2006; SUNTORNSUK, 2002). Neste sentido, para a avaliação de alguns compostos, tais como os compostos fenólicos, os açúcares e o 5-HMF nas amostras de méis de abelhas sem ferrão será utilizada técnica cromatográfica (LC-MS/MS do inglês *Liquid chromatography - tandem mass spectrometry*) e eletroforese capilar (CE do inglês *Capillary electrophoresis*).

## 6.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS - do inglês: *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*)

A cromatografia é um método empregado de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. É uma técnica na qual os componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade nas quais são transportados através de uma fase fixa estacionária por uma fase móvel líquida ou gasosa. Ou seja, uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido na fase estacionária, o que resulta em migrações de diferenciais desses componentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG et al., 2006).

A cromatografia pode ser combinada com diferentes sistemas de detecção. A LC-MS/MS combina as vantagens da cromatografia líquida, como alta seletividade e eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas, como obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade, permitindo a separação dos analitos, sua identificação e confirmação em concentrações da ordem de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ou menores (LACINA et al., 2010).

A espectrometria de massas *em tandem* (MS/MS) pode ser considerada como um método que envolve, pelo menos, duas fases de análise de massas, onde, primeiro um analisador é utilizado para isolar o íon precursor, que em seguida, é submetido à fragmentação para produzir íons dos produtos e fragmentos neutros, que serão então analisadas por um segundo analisador de massas (PRASAIN, 2012).

Em mel de *Apis mellífera*, Kaplan, Olgun e Karaoglu (2014) utilizaram LC-MS/MS para análise de grayanotoxins I e III (substância tóxica encontrada em plantas do gênero *rhododendron*). Truchado e colaboradores (2011) utilizaram HPLC/DAD-MS (cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos acoplada a espectrometria de massas) para determinação de flavonoides em méis de abelhas sem ferrão, assim como Zhou e colaboradores (2014) utilizaram a mesma técnica para determinação da classificação floral de méis de *Apis mellífera*. Enquanto que Sergiel, Pohl e Biesaga (2014) utilizaram HPLC/ESI-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com

ionização por eletrospray) na avaliação dos compostos fenólicos de méis poloneses de *Apis mellifera*.

## 6.2 Eletroforese capilar (CE – do inglês: *Capillary electrophoresis*)

A eletroforese capilar tem se mostrado, nos últimos anos, uma técnica avançada, rápida e econômica na determinação de compostos químicos. Muito utilizada em diferentes matrizes (sucos, iogurte, frutas, vinhos, arroz, bebidas e méis), a CE vem sendo amplamente estudada (LANDERS, 2008; ROVIO; SIRÉN; SIRÉN, 2011).

A CE é uma técnica de separação com base na migração da substância a analisar em solução, sob a influência de um campo elétrico. Na separação eletroforética é essencial que o analito seja iônico ou ionizável. Desta forma, a velocidade de migração da substância a analisar irá depender basicamente da sua carga e do seu tamanho sob um campo elétrico homogêneo, podendo também ser modificada por várias interações químicas ou físicas entre o analito e o meio eletroforético, como aditivos ou redes de polímeros (SKOOG et al., 2006; LANDERS, 2008).

Pode ser realizada utilizando diferentes modos de separação, os quais irão permitir uma grande variedade de aplicações desta técnica, como a utilização dos modos de eletroforese capilar de zona (CZE- do inglês: *Capillary zone electrophoresis*) e de cromatografia eletrocínética micelar capilar (MEKC- do inglês: *micellar electrokinetic chromatography*), sendo estes os dois métodos de separação mais utilizados para análises de alimentos (LANDERS, 2008).

A CZE é uma técnica baseada na diferença entre as mobilidades de espécies carregadas em eletrólitos aquosos e não aquosos contendo ou não aditivos de forma a interagir com o analito e alterar as mobilidades eletroforéticas (SUNTORNUSUK, 2002; SKOOG et al., 2006). Enquanto que a MECK é baseada na adição de tensoativos ao eletrólito de corrida, caracterizada pela partição dos analitos entre a fase micelar e o eletrólito, permitindo a separação de compostos neutros com caráter hidrofóbico (TERABE et al., 1984; LANDERS, 2008).

Estudos com mel utilizando a CE ainda são escassos, Rizelio e colaboradores (2012a; 2012b; 2012c) desenvolveram trabalhos com CE para determinação de carboidratos, 5-HMF e cátions, Moreno-González e colaboradores (2015) para determinação de aminoglicosídeos e Liang et al. (2016) para carboidratos, todos em mel de *Apis mellifera*. Em mel de abelhas sem ferrão, Biluca e colaboradores (2014) utilizaram a CE

para determinação de 5-HMF e açúcares, assim como Ramón-Sierra, Ruiz-Ruiz e Ortiz-Vázquez (2015) utilizaram eletroforese em gel para determinação de proteínas.



## **CAPÍTULO 2**

**ESTABILIDADE QUÍMICA DE MÉIS DE ABELHAS SEM  
FERRÃO (*Meliponinae*) SUBMETIDOS AOS GRADIENTES  
TÉRMICOS SUGERIDOS PELA LEGISLAÇÃO  
BRASILEIRA VIGENTE PARA MÉIS DE *Apis mellífera*.**



## RESUMO

Neste estudo os gradientes térmicos recomendados pela legislação brasileira vigente para utilização em méis de *Apis mellifera* foram aplicados em méis de abelhas sem ferrão, buscando avaliar sua estabilidade química frente os parâmetros de identidade e qualidade (umidade, condutividade elétrica, acidez livre, pH, 5-hidroximetilfurfural, diastase, frutose, glicose e sacarose), compostos fenólicos totais e atividade antioxidante e redutora (DPPH e FRAP). O estudo foi realizado com dez amostras provenientes de meliponários do estado de Santa Catarina, caracterizadas *in natura* e depois submetidas às diferentes condições térmicas sugeridas pela legislação. O resultado da caracterização *in natura* mostrou que 100% das amostras analisadas obtiveram valores superiores de umidade ao que é preconizado pela legislação de méis de *Apis mellifera* (20% m/m), assim como 20% das amostras mostraram resultado superior a 50 mEq kg<sup>-1</sup> de acidez, máximo permitido pela legislação. Os dados de açúcares redutores também revelaram que 60% das amostras obtiveram teores inferiores ao mínimo recomendado pela legislação, que é de 65% (m/m). Para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante as amostras *in natura* apresentaram valores similares ao relatados pela literatura para méis de *Apis mellifera*. Nas amostras submetidas aos gradientes térmicos recomendados pela legislação não foram observadas alterações estatisticamente significativas para os parâmetros de identidade e qualidade, incluindo 5-hidroximetilfurfural e índice de diastase, mesmo considerando sua elevada relação com o aquecimento. Alterações no conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH) também não foram observadas. Porém, reduções nos valores puderam ser observados para atividade redutora (FRAP). A partir da avaliação dos resultados podemos considerar que os tratamentos térmicos aplicados não acarretam modificações químicas estatisticamente significativas ao produto mel de abelhas sem ferrão.

**Palavras-chave:** Mel. Melipona. Caracterização. Tratamento térmico. Legislação.



## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão (abelhas nativas ou indígenas) pertencem à subfamília *Meliponinae*, a qual pode ser dividida em três tribos (*Meliponini*, *Trigonini* e *Lestrimellitini*), apresentando diversos gêneros, variações na morfologia e distintos hábitos de nidificação (construção de ninho), coleta de alimento, comportamento e ecologia. As abelhas sem ferrão são assim conhecidas por possuírem o ferrão atrofiado ou ausência do mesmo e por isso são dóceis e de fácil manejo (KERR, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Nativas do território brasileiro, estas abelhas apresentam características distintas das demais espécies de abelhas, tais como: coleta de néctar de plantas rasteiras, revoadas curtas na procura de alimentos, colmeias no sentido horizontal e sem elaboração de favos para a reserva de alimentos, construindo potes constituídos de cerume (mistura de própolis, cera e terra) no formato oval para o armazenamento de mel e pólen (CARVALHO et al., 2005; VILLAS-BÔAS, 2012).

Tais diferenças refletem diretamente no mel produzido por estas abelhas. Estudos têm verificado que o mel de abelhas sem ferrão apresenta elevados conteúdos de umidade e acidez e baixos teores de açúcares, tornando-o bastante peculiar, com atributos próprios (ALMEIDA-MURADIAN, 2013; SILVA et al., 2013; ALMEIDA-MURADIAN; STRAMM; ESTEVINHO, 2014; RAMÓN-SIERRA; RUIZ-RUIZ; ORTIZ-VÁZQUEZ, 2015; CHUTTONG et al., 2016; DE SOUSA et al., 2016). No entanto, devido a estas características distintas do mel de *Apis mellifera*, este pode apresentar possível instabilidade no armazenamento, acarretado principalmente por elevados teores de umidade, comprometendo em alguns casos a vida de prateleira e consequentemente sua qualidade. Buscando estender a vida de prateleira do produto, sem que suas propriedades químicas e nutricionais sejam alteradas, algumas técnicas já vêm sendo estudadas e aplicadas, como a desidratação, o tratamento térmico e a refrigeração, ganhando destaque o tratamento térmico por se mostrar simples e eficaz (KOWALSKI, 2013; ESCRICHE et al., 2014; BILUCA et al., 2014; CHAIKHAM; PRANGTHIP, 2015).

A Portaria nº 6 de 25 de julho de 1985, que prioriza o mel de abelhas *Apis mellifera*, traz as normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para o mel, cera de abelhas e derivados, apresentando em seu contexto a utilização de tratamento térmico como fase de

beneficiamento (BRASIL, 1985). A recomendação da utilização de binômios específicos de tempo/temperatura tem como objetivo minimizar a carga microbiológica existente e conseqüentemente evitar a fermentação precoce, formar um produto homogêneo sem formação de cristais de açúcares com boa aparência comercial e preservar as características químicas e físicas do mel (BILUCA et al., 2014).

Por outro lado o tratamento térmico pode afetar a atividade diastásica do mel, uma vez que as enzimas diastases ( $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases) são sensíveis ao calor (termoláveis), assim como aumentar o conteúdo de 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) em virtude da utilização de elevadas temperaturas, já que este composto é formado através da *reação de Maillard* e na desidratação direta de açúcares em condições ácidas (AHMED et al., 2013; BILUCA et al., 2014). Buscando minimizar tais efeitos, ou até mesmo cessá-los, tecnologias que primam pela manutenção das características originais devem ser priorizadas a fim de manter os padrões de identidade e qualidade do produto.

Uma vez que a literatura é escassa quanto a processos de conservação para o mel de abelhas sem ferrão, e a atual legislação, que sugere o tratamento térmico, é específica para o mel de *Apis mellífera*, se fazem necessários novos estudos. Além do mais, o beneficiamento deste produto pode estar ocorrendo de forma ineficaz quando baseado na legislação de *Apis mellífera*, podendo acarretar em processos degradativos, retardando sua vida de prateleira, já que o mel de abelhas sem ferrão apresenta características físicas e químicas distintas do mel de *Apis mellífera*.

Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade química dos méis de abelhas sem ferrão quando aplicados os tratamentos térmicos sugeridos pela legislação de mel de *Apis mellífera*, buscando verificar os efeitos sobre os parâmetros de identidade e qualidade, bem como o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante e redutora.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

Para realização das análises foram utilizados os reagentes: tetraborato de sódio (TBS), dodecil-sulfato de sódio (SDS), brometo de cetil-trimetil-amônio (CTBA), ácido sórbico, cafeína, Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

(DPPH) e 5-hidroximetilfulfural (5-HMF), obtidos da Sigma Aldrich (Santa Ana, E.U.A).

Os reagentes, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, cloreto de sódio, acetato de sódio, amido solúvel, fosfato monossódico heptahidratado, iodo, ácido ascórbico, cloreto férrico, sulfato ferroso, ácido gálico, carbonato de sódio, frutose, glicose, sacarose e o solvente metanol, foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água utilizada foi filtrada por sistema de desionização (desionizador Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA).

Os principais instrumentos utilizados foram: refratômetro Abbe Tropenmodell I (Carl Zeiss, Alemanha), termômetro digital, condutivímetro Tec-4MP (Tecnal, Brasil), pHmetro DM-20 (Digimed, Brasil), espectrofotômetro modelo SB 1810-S (Spectro Visium, Brasil), eletroforese capilar modelo 7100 (Agilent Technologies, EUA), banho termostatizado modelo 550 (Fisatom, Brasil), ultrassom (Cristófoli, Brasil), centrífuga MiniSpin plus (Eppendorff, Alemanha), vortex 772 (Fisatom, Brasil), balança analítica AB204-S (Mettler Toledo, Suíça), purificador de água Simplicity UV (sistema Milli - Q, Millipore, EUA). O *software* HP ChemStation e Statistic 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) foram utilizados para aquisição e tratamento dos dados.

## 2.2 Amostras

Foram analisadas dez amostras de mel de abelhas sem ferrão obtidas de meliponicultores do município de São Miguel do Oeste e Santa Rosa de Lima, estado de Santa Catarina. As amostras foram coletadas entre os meses de novembro e dezembro de 2013, originárias de floradas predominantes silvestres e vassourão amarelo (*Vernonanthura discolor*). A descrição das espécies, sua terminologia popular, localidade de origem e florada estão descritas na Tabela 2.1. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas em frascos de polipropileno do tipo falcon, mantidos ao abrigo da luz, sob refrigeração (gelo) e transportadas ao Laboratório de Química de Alimentos do CCA – UFSC, onde foram mantidas em temperatura de  $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

Tabela 2.1 - Identificação das espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae), sua terminologia popular, localidade de origem e florada predominante.

Amostra	Nome popular	Nome científico	Local	Florada
A	Guaraipo	<i>Melipona bicolor</i>	SRL	Vassourão
B	Guaraipo	<i>Melipona bicolor</i>	SMO	Silvestre
C	Tubuna	<i>Scaptotrigona bicunctata</i>	SMO	Silvestre
D	Mandaçaia	<i>Melipona quadriasciata</i>	SMO	Silvestre
E	Manduri	<i>Melipona marginata</i>	SMO	Silvestre
F	Jataí	<i>Tetragonisca angustula</i>	SMO	Silvestre
G	Bugia	<i>Melipona mondury</i>	SMO	Silvestre
H	Iraí	<i>Nanotrigona testaceicornis</i>	SMO	Silvestre
I	Vorá/Borá	<i>Tetragona clavipes</i>	SMO	Silvestre
J	Uruçu	<i>Melipona scutellaris</i>	SMO	Silvestre

SRL: Santa Rosa de Lima; SMO: São Miguel do Oeste.

Fonte: próprio autor

### 2.3 Parâmetros de Identidade e Qualidade

Todas as amostras foram preparadas em triplicatas e analisadas conforme descrito a seguir.

#### 2.3.1 Umidade

O conteúdo de umidade foi determinado por refratometria, à temperatura ambiente, utilizando um refratômetro de Abbé. Levando em consideração que o índice de refração (IR) das substâncias depende da temperatura e da concentração, a correção do IR para amostras com temperaturas diferentes de 20°C foi realizada aplicando-se o fator de correção de 0,00023 ao IR para cada grau acima ou abaixo de 20°C (AOAC, 2005). O teor de umidade correspondente ao IR obtido foi devidamente ajustado para a temperatura, calculados através da Equação (1) de Wedmore, e os resultados expressos em % (m/m) (WEDMORE, 1955).

$$W_{wed} = \frac{-2681 - \log (IR-1)}{0,002243} \quad (1)$$

Sendo:

$W_{wed}$  corresponde ao teor de umidade de Wedmore e;  
IR ao índice de refração.

### 2.3.2 Sólidos solúveis

Os sólidos solúveis (°Brix) foram determinados na mesma condição analítica citada acima através de leitura no refratômetro de Abbé, em temperatura ambiente, segundo a AOAC (2005).

### 2.3.3 Acidez livre

O método fundamenta-se na neutralização de uma massa determinada de mel por solução padronizada de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> até pH 8,5. Massas de 10 g de amostra foram diluídas em 75 mL de água desionizada sob agitação magnética, tendo seu pH monitorado com o auxílio de um pHmetro, obtendo-se os valores iniciais de pH seguido de titulação com solução padronizada de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> até alcançar pH 8,5. O valor da acidez livre foi calculado através da Equação (2), e os resultados expressos em mEq kg<sup>-1</sup> (AOAC, 2005).

$$\text{Acidez livre} = \frac{(v \times f \times 100)}{m} \quad (2)$$

Sendo:

$v$  corresponde ao volume (mL) de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> gasto na titulação da amostra,

$f$  é o fator de correção da molaridade da solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> ;

$m$  é a massa da amostra (g) utilizada na análise.

### 2.3.4 Açúcares

Os açúcares frutose, glicose e sacarose foram determinados segundo Rizelio e colaboradores (2012a) através do método indireto de eletroforese capilar, com eletrólito de corrida composto de 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sórbico, 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de CTAB e 40 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH, em pH 12,2. O capilar utilizado continha 60 cm de comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno, com injeção realizada no modo hidrodinâmico (50 mbar, 3 s), voltagem aplicada de 25 kV e temperatura mantida a 25°C, com detecção indireta em 254 nm. A coleta dos dados foi realizada através do *software* HP ChemStation e os resultados expressos em % (m/m).

### 2.3.5 Atividade diastásica

Determinada de acordo com o método n° 7.7 descrito pelo *Codex Alimentarius Commission*, onde massas de 1 g de mel foram diluídas em 10 mL de água desionizada, tamponadas com 2,5 mL de tampão acetato

1,60 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,3) e adicionadas de 1,5 mL de NaCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> com volume aferido para 25 mL com água desionizada e mantida em banho a 40 °C. Após estabilidade da temperatura (15 minutos), 5 mL desta solução foi adicionada de 2,5 mL de solução de amido 1% na mesma condição de temperatura, com agitação e cronometragem do tempo. Após 5 minutos, 0,25 mL da mistura foram combinados com 2,5 mL de uma solução de iodo 0,00035 mol L<sup>-1</sup> e com o volume de água desionizada requerido para absorvância inicial a 660 nm de  $0,760 \pm 0,02$ . A reação foi repetida em intervalos de 5 minutos até que a absorvância atingisse 0,235 ou menos. Com os valores obtidos, foi construído um gráfico da absorvância *versus* o tempo, para o cálculo de  $t_x$ , que é o tempo (minutos) necessário para atingir a absorvância de 0,235. O quociente  $300/t_x$  resultou na atividade diastásica, definida como mL de solução de amido 1%, hidrolisada/hora pela enzima presente em 1 g de mel, expressa em un. Göthe (CAC, 1990).

#### 2.3.6 5-Hidroximetilfurfural

O conteúdo de 5-HMF foi determinado segundo método descrito por Rizelio e colaboradores (2012b), utilizando eletroforese capilar através do método de cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), aplicando as seguintes condições analíticas: eletrólito de corrida composto de TBS 5 mmol L<sup>-1</sup> e SDS 120 mmol L<sup>-1</sup>, com pH final de 9,3; capilar de 32 cm de comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno; injeção hidrodinâmica a 50 mbar durante 3 segundos; voltagem de 15 kV; temperatura de 25°C; com detecção direta em 284 nm. A coleta dos dados foi realizada através do *software* HP ChemStation e os resultados expressos em mg kg<sup>-1</sup>.

#### 2.3.7 Condutividade elétrica

Foi determinada de acordo com metodologia descrita por Bogdanov (1999), em solução de mel a 20% (m/v) em água desionizada, a 25°C, com auxílio de condutímetro, previamente calibrado. Os resultados foram obtidos diretamente no equipamento e expressos em mS cm<sup>-1</sup>.

#### 2.3.8 Determinação de pH

Os valores de pH das amostras foram obtidos segundo método 962.19, descrito na AOAC (2005), a partir de solução de mel a 20% (m/v) em água desionizada, a 25°C, com auxílio de pHmetro digital previamente calibrado em pH 4,01 e 6,86 (AOAC, 2005).

## 2.4 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

### 2.4.1 Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram analisados segundo o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), onde triplicatas de 100  $\mu\text{L}$  das soluções aquosas das amostras ( $0,25 \text{ g mL}^{-1}$ ) foram acondicionadas em balão volumétrico de 10 mL, sendo adicionadas 2 mL de água desionizada, homogeneizadas, seguidas da adição de 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, novamente homogeneizadas e adicionadas de 1,5 mL de solução de carbonato de sódio 20% (m/v), volume aferido com água desionizada com posterior homogeneização. A solução permaneceu ao abrigo de luz por 2 horas, em temperatura ambiente, seguida da medida da absorbância em espectrofotômetro a 764 nm. Provas em branco (3) foram realizadas, utilizando água desionizada em substituição a solução de mel. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi calculado a partir curva analítica construída simultaneamente utilizando ácido gálico ( $30 - 300 \text{ mg L}^{-1}$ ) como referência (Apêndice A), e os resultados expressos em miligramas de equivalente a ácido gálico ( $\text{mg EAG}$ ) em  $100 \text{ g}^{-1}$  de mel.

### 2.4.2 Atividade antioxidante e redutora

A atividade antioxidante, referente às substâncias presentes nos méis foi avaliada através de dois métodos baseados em diferentes princípios e condições experimentais: o método de sequestro de radicais livres DPPH, de acordo com Brand-Williams, Cuverlier e Berset (1995) e o método do poder redutor FRAP, descrito por Benzie e Strain (1996), modificado por Bertoncelj e colaboradores (2007). A solução das amostras utilizadas nas determinações de DPPH e FRAP foram preparadas com 2,5 g de mel diluídos com água desionizada e avolumados para 5 mL.

Para a determinação da atividade antioxidante o radical DPPH foi preparado, na concentração de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , em metanol. Essa solução foi diluída na proporção 1:100, em metanol:água 80% v/v, ajustando a absorção para valores iniciais de 0,800 em 515 nm. Em uma série de três células (1 cm de caminho ótico), foram lidas as absorbâncias de 2,9 mL da solução de DPPH ( $A_0$ ) e, em seguida, adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de mel ( $0,25 \text{ g mL}^{-1}$ ) a cada célula. A mistura foi homogeneizada e mantida ao abrigo da luz por um tempo exato de 30 minutos a  $25^\circ\text{C}$  e logo após as absorbâncias foram novamente medidas ( $A_{30}$ ). Provas em branco (3) foram realizadas, utilizando água desionizada em substituição

a solução de mel. As porcentagens de inibição dos radicais foram calculadas através da Equação (3). Uma curva padrão foi preparada aplicando ácido ascórbico ( $80 - 560 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Apêndice B), e os resultados expressos em miligramas equivalentes a ácido ascórbico (mg EAA) em  $100 \text{ g}^{-1}$  de mel (BRAND-WILLIAMS; CUVERLIER; BERSSET, 1995).

$$\% = (1 - A_{30}/A_0) \times 100 \quad (3)$$

A determinação do poder redutor foi realizada através de um sistema reacional contendo uma parte de solução de TPTZ  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  em HCl  $40 \text{ mmol L}^{-1}$ , uma parte de  $\text{FeCl}_3$   $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , e dez partes de tampão acetato de sódio  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,6, definido como o reativo de FRAP, preparado no momento da análise. Alíquotas de  $0,4 \text{ mL}$  ( $0,25 \text{ g mL}^{-1}$ ) em triplicatas da solução de mel foram adicionadas de  $3,6 \text{ mL}$  do reagente de FRAP e mantidas ao abrigo da luz por 10 minutos em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ . Provas em branco (3) foram realizadas, utilizando água desionizada em substituição a solução de mel. A seguir as absorbâncias foram medidas a  $594 \text{ nm}$  e os resultados calculados com base na equação de reação do padrão aquoso de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $25 - 600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) aplicado no preparação da curva analítica (Apêndice C) e expressos em  $\mu\text{mols}$  equivalentes a Fe (II) por  $100 \text{ g}^{-1}$  de mel (BENZIE; STRAIN, 1996; BERTONCELJ et al., 2007).

## 2.5 Gradientes térmicos

As amostras de méis foram submetidas aos gradientes térmicos sugeridos pela Portaria nº 6 de 25 de julho de 1985, a qual aprova as Normas Higiênico-Sanitárias e Tecnológicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados e propõe a utilização de determinados tempos e temperaturas como tratamento térmico ao qual devem sofrer as amostras de mel de *Apis mellífera* recém desoperculadas e centrifugadas (Tabela 2.2) (BRASIL, 1985).

Tabela 2.2 - Recomendação do binômio tempo/temperatura para méis de *Apis mellífera*, através da Portaria n° 6 de 25 julho de 1985.

<b>Tratamentos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
T1	52,0	470 min
T2	54,5	170 min
T3	57,0	60 min
T4	59,5	22 min
T5	65,5	7,5 min
T6	65,5	2,8 min
T7	68,0	1,0 min
T8	71,1	24,0 seg

Fonte: Brasil (1985).

As amostras de méis de abelhas sem ferrão foram aquecidas em banho de água de acordo com o binômio tempo/temperatura apresentado na Tabela 2.2, sendo controlados com termômetro digital inserido no interior do recipiente contendo a amostra e cronômetro digital. Após o completo ciclo (tempo e temperatura) as amostras tiveram sua temperatura restabelecida em banho de gelo e analisadas de acordo com os métodos já descritos.

## 2.6 Análise Estatística

O *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, E.U.A) foi utilizado para auxiliar o tratamento dos dados obtidos. Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras de mel, e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As médias de cada espécie foram então submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para verificar diferenças entre as médias, sendo que diferenças ao nível de 95% ( $p < 0,05$ ) foram consideradas estatisticamente significantes.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Parâmetros de identidade e qualidade para méis *in natura*

Os parâmetros de identidade e qualidade (umidade, sólidos solúveis, condutividade elétrica, acidez livre e pH) avaliados nos méis de abelhas sem ferrão *in natura* estão expostos na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Características físico-químicas determinadas nas amostras de mel de abelhas sem ferrão (Meliponinae) *in natura*.

Amostra	Umidade % (m/m)	Sólidos solúveis (°Brix)	Condutividade elétrica (mS cm <sup>-1</sup> )	Acidez livre (mEq kg <sup>-1</sup> )	pH
A	32,22 ± 0,01 <sup>h</sup>	67,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>b</sup>	32,08 ± 0,89 <sup>c</sup>	3,37 ± 0,01 <sup>a</sup>
B	27,06 ± 0,24 <sup>d,e</sup>	72,20 ± 0,29 <sup>c,d</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>c</sup>	31,27 ± 0,29 <sup>c</sup>	3,40 ± 0,01 <sup>b</sup>
C	25,15 ± 0,01 <sup>c</sup>	73,90 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>f</sup>	46,37 ± 0,91 <sup>e</sup>	4,07 ± 0,02 <sup>h</sup>
D	26,93 ± 0,24 <sup>d,e</sup>	72,30 ± 0,29 <sup>c,d</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>d</sup>	22,38 ± 0,72 <sup>b</sup>	3,69 ± 0,02 <sup>d</sup>
E	27,20 ± 0,01 <sup>c</sup>	72,00 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	35,46 ± 0,70 <sup>d</sup>	3,83 ± 0,03 <sup>f</sup>
F	23,93 ± 0,01 <sup>a</sup>	75,50 ± 0,01 <sup>g</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>h</sup>	23,17 ± 0,21 <sup>b</sup>	5,18 ± 0,03 <sup>i</sup>
G	27,62 ± 0,01 <sup>f</sup>	72,00 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>d</sup>	33,31 ± 1,37 <sup>c</sup>	3,60 ± 0,01 <sup>c</sup>
H	26,79 ± 0,01 <sup>d</sup>	72,50 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>g</sup>	86,08 ± 0,27 <sup>f</sup>	3,62 ± 0,02 <sup>a,c</sup>
I	28,58 ± 0,24 <sup>g</sup>	70,80 ± 0,29 <sup>b</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>i</sup>	99,42 ± 1,55 <sup>g</sup>	3,89 ± 0,02 <sup>g</sup>
J	24,74 ± 0,01 <sup>b</sup>	74,50 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>c</sup>	19,32 ± 0,64 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,01 <sup>c</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,h,i,c,d,e,f,g,h,i</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras de A-J: espécies de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1.

Fonte: próprio autor

Para os teores de umidade os valores encontrados variaram de 23,93 (*Tetragonisca angustula*) a 32,22% (m/m) (*Melipona bicolor*) (Tabela 2.3), apresentando diferença significativa entre médias ( $p < 0,05$ ). É possível observar que amostras provenientes da mesma localidade (São Miguel do Oeste) e florada (Silvestre), porém de espécies distintas diferem entre si (C, F, G, I e J). Da mesma forma que, mesmo as amostras da mesma espécie de abelha, A e B (*Melipona bicolor*), mas de florada e localidade distintas também apresentaram diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).

A atual legislação brasileira e a legislação internacional, específica para o mel de *Apis mellifera*, prevê que o mel deve conter no máximo 20% de umidade (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001). No entanto, diversos estudos que caracterizam o mel de abelhas sem ferrão evidenciam ser uma característica própria deste tipo de mel níveis mais elevados de umidade, mesmo quando tomados todos os cuidados necessários em relação ao manejo, sendo este um dos principais

parâmetros que o distingue do mel de *Apis mellifera*. De Sousa e colaboradores (2016) e Silva e colaboradores (2013) ao analisarem méis brasileiros de Uruçu (*Melipona scutellaris*) e Jandaíra (*Melipona subnitida*) encontraram valores entre 23,9 e 28,9% (m/m) e 22,2 e 24,4% (m/m), respectivamente, assim como Guerrini e colaboradores (2009) obtiveram em méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão do Equador, em média 34,1% (m/m), Ramón-Sierra, Ruiz-Ruiz e Ortiz-Vázquez (2015) em méis provenientes do México resultados entre 22,8 e 25,0% (m/m) e Chuttong e colaboradores (2016) em méis da Tailândia, valores entre 25,0 e 47,0% (m/m).

Os elevados teores de umidade podem ser provenientes da baixa desidratação do néctar durante o processo natural de transformação em mel, podendo também estar relacionado com o ambiente tropical úmido, a coleta de néctar de flores mais rasteiras e de frutos maduros com maior conteúdo de água, época de colheita, grau de maturidade alcançado na colmeia, condições edafoclimáticas, ou mesmo as diferentes espécies de abelhas (GUERRINI et al., 2009; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Por outro lado, méis com elevados teores de umidade estão mais propensos à fermentação por ação das leveduras osmofílicas devido a elevada atividade de água (Aa). O que poderá causar, conseqüentemente, alterações sensoriais e físico-químicas no mel (GUERRINI et al., 2009). No entanto, Bejlsma e colaboradores (2006) em seus estudos verificaram que determinados méis de abelhas sem ferrão, mesmo com maiores conteúdos de umidade, após certo período de estocagem, permaneceram com cor e sabor inalteráveis. Tal fato deve-se a possível presença de polifenóis, derivados das floradas em que foram coletados e também ao processo enzimático no cerume, realizados pelas abelhas na colmeia (BEJLSMA et al., 2006; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

A concentração de sólidos solúveis (°Brix) em mel é considerada um parâmetro importante na garantia da qualidade contra adulterações, uma vez que esta diretamente relacionada com o conteúdo de açúcar (DE SOUSA et al., 2016). Nos méis de abelhas sem ferrão analisados, os resultados obtidos variaram de 67,00 (*Melipona bicolor*) a 75,50 °Brix (*Tetragonisca angustula*) (Tabela 2.3), apresentando diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ). Méis de abelhas *Apis mellifera* apresentam, geralmente, valores superiores de °Brix, desta forma valores mais baixos, obtidos para méis de abelhas sem ferrão, podem estar diretamente relacionado ao elevado conteúdo de água encontrado

neste produto e conseqüentemente menor teor de açúcar (DE SOUSA et al., 2016).

Os valores de condutividade elétrica encontrados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão variaram de 0,17 (*Melipona marginata*) a 0,80 mS cm<sup>-1</sup> (*Tetragona clavipes*) (Tabela 2.3) e indicaram que as amostras diferem entre si ( $p < 0,05$ ), com exceção das amostras G (*Melipona mondury*) e D (*Melipona quadrifasciata*) as quais são estatisticamente semelhantes. A legislação brasileira não define limites para tal parâmetro, enquanto que a legislação internacional para méis de *Apis mellifera* determina máximo de 0,8 mS cm<sup>-1</sup> (CODEX STAN 12, 2001). Desta forma, todos os méis de abelhas sem ferrão analisados estão de acordo com o que preconiza a legislação internacional específica para méis de *Apis mellifera*. No entanto, alguns autores têm observado valores de condutividade elétrica, para méis de abelhas sem ferrão, de diversas regiões, acima do máximo estipulado por tal regulamentação, com variações entre 0,30 - 2,8 mS cm<sup>-1</sup> (FUENMAYOR et al., 2013; CHUTTONG et al., 2016; DE SOUSA et al., 2016).

A condutividade elétrica também tem sido apresentada, por alguns autores, como um bom parâmetro na determinação botânica do mel (FEÁS et al., 2010; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013). Porém, apesar das amostras B, C, E, F, H, I e J serem da mesma origem floral (silvestre), houve diferença significativa entre elas, contrariando estudos dos quais mencionam que independente da espécie de abelha e condições edafoclimáticas em que os méis foram produzidos, os valores de condutividade elétrica devem ser semelhantes quando a mesma origem floral é utilizada (FEÁS et al., 2010; ALMEIDA-MURADIAN et al., 2013). Segundo Crane (1985), variações no conteúdo de condutividade elétrica no mel podem ser explicadas pela influência de uma série de fatores, tais como os teores de ácidos orgânicos, sais minerais e proteínas, compostos que variam de acordo com a espécie de abelha e condições edafoclimáticas.

A acidez livre encontrada nas amostras analisadas mostraram resultados que variaram entre 19,32 (*Melipona scutellaris*) a 99,42 mEq kg<sup>-1</sup> (*Tetragona clavipes*) (Tabela 2.3). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre méis de diferentes espécies de abelhas, independentemente de serem provenientes da mesma localidade e florada (amostras B, C, D, E, F, G, H, I e J). Também foi possível observar que as amostras de mesma espécie de abelha, mas de localidade e florada distintas, amostras A e B (*Melipona bicolor*) não

apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), sugerindo uma expressiva influência da espécie de abelha neste parâmetro, necessitando a realização de maiores estudos.

Variações no conteúdo de acidez podem ser ocasionadas, provavelmente, pela influência de diferentes fontes de néctar, que resultam na variação dos tipos de ácidos orgânicos presentes no mel, pela atividade enzimática da glicose-oxidase que origina o ácido glucônico, e ainda, pela quantidade de minerais presentes no mel (OLIVEIRA; SANTOS, 2011). Considerando o definido pela legislação brasileira e internacional para o mel de *Apis mellífera* (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001) como valor máximo de acidez livre igual ou menor que  $50 \text{ mEq kg}^{-1}$ , duas das amostras, H (*Nanotrigona testaceicornis*) e I (*Tetragona clavipes*), apresentam valores superiores a esta referência. No entanto, deve-se ressaltar que estudos como o de Silva e colaboradores (2013), Fuenmayor e colaboradores (2013) e Dardón, Maldonado-Aguilera e Enríquez (2013) que também avaliaram amostras de mel de abelhas sem ferrão, encontraram acidez máxima de 59,66, 57,83 e 85,53  $\text{mEq kg}^{-1}$ , respectivamente, o que sugere ser esta uma característica própria deste tipo de mel.

Os valores de pH encontrados variaram de 3,37 (*Melipona bicolor*) a 5,18 (*Tetragonisca angustula*) (Tabela 2.3) definindo às amostras um caráter ácido, similar ao pH observado para méis de *Apis mellífera* (3,2 – 4,5). Segundo Crane (1985), os valores de pH podem ser influenciados pelo pH do néctar, solo ou associação de néctares para sua composição, fatores estes que podem justificar o fato de todas as amostras terem diferido entre si ( $p < 0,05$ ) e em sua maioria terem origem floral diversificada (silvestre). Observa-se também que os méis de diferentes espécies de abelhas, mesmo quando produzidos na mesma localidade, apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (B, C, D, E, F, G, H, I e J), o que poderia ser explicado devido às substâncias mandibulares acrescidas ao néctar, durante o transporte do mesmo até a colmeia (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Atualmente o pH não é um parâmetro obrigatório no controle de qualidade do mel brasileiro e nem é preconizado pela legislação internacional do mel, mas sua avaliação tem grande importância na definição da forma de manejo e armazenamento do mel, levando em consideração que o pH e a acidez são importantes fatores antimicrobianos, capazes de proporcionar maior estabilidade e vida de prateleira do produto, assim como influenciar na velocidade de formação do 5-HMF (GUERRINI et al., 2009).

Os níveis de 5-HMF e a atividade diastásica também foram determinados nas amostras *in natura*, considerando a importância destes parâmetros na avaliação da qualidade do mel. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Conteúdo de 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) e atividade diastásica determinados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão *in natura* (Meliponinae).

Amostra	HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Diastase (un. Göthe)
A	< LOQ	< 3
B	< LOQ	< 3
C	< LOQ	< 3
D	< LOQ	< 3
E	< LOQ	< 3
F	< LOQ	46,14 ± 0,32 <sup>c</sup>
G	< LOQ	< 3
H	< LOQ	18,06 ± 0,10 <sup>a</sup>
I	< LOQ	28,75 ± 0,05 <sup>b</sup>
J	< LOQ	< 3

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c,d</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). LOQ – Limite de quantificação (0,31 mg L<sup>-1</sup>) na curva de calibração. Letras de A-J: espécies de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1.

Fonte: próprio autor

Valores de 5-HMF nas amostras *in natura* se apresentaram abaixo do limite de quantificação (0,31 mg L<sup>-1</sup>). Em geral, estudos com méis de abelhas sem ferrão, de diversas regiões (Equador, Brasil, Venezuela, Colômbia, Guatemala e Tailândia) tem demonstrado quantidades de 5-HMF inferiores a 15 mg kg<sup>-1</sup>, sendo muitas vezes não detectado nas amostras analisadas (GUERRINI et al., 2009; SILVA et al., 2013; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013; CHUTTONG et al., 2016).

Para o índice de diastase os resultados encontrados foram de < 3 a 46,14 un. Göthe (Tabela 2.4), apresentando diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ). A legislação brasileira e internacional, para mel de *Apis mellifera*, determina que méis frescos, que não tenham sofrido aquecimento e nem passado por longo período de estocagem, devem possuir diastase superior a 8 un. Göthe, ou então, para aqueles méis com baixo conteúdo enzimático, devem ter no mínimo diastase igual ou superior a 3 un. Göthe, sempre que o conteúdo de 5-HMF não exceda a 15 mg kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000; CODEX STAN 12, 2001). Parâmetros

atendidos por todas as amostras analisadas, destacando sua excelente procedência. Tais resultados são similares ao observado por diversos autores para méis de abelhas sem ferrão, os quais relatam índice de diastase entre 1,6 e 21,3 un. Göthe (GUERRINI et al., 2009; DARDÓN; MALDONADO-AGUILERA; ENRÍQUEZ, 2013; FUENMAYOR et al., 2013; VIT, 2013; CHUTTONG et al., 2016).

Os açúcares são os principais componentes do mel, sendo os monossarídeos (frutose e glicose) os majoritários, onde sua quantidade tem expressiva influência nas características do mel, de forma que a frutose representa a doçura em razão da alta higroscopicidade e a glicose, que por ser pouco solúvel determina a tendência à cristalização (CARVALHO et al., 2005). A Tabela 2.5 apresenta os resultados obtidos na determinação da quantidade de frutose, glicose e sacarose nos méis de abelhas sem ferrão.

Tabela 2.5 - Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose e sacarose encontradas nas amostras de mel de abelhas sem ferrão *in natura* (Meliponinae).

Amostra	Frutose	Glicose	F+G	F/G	G/U	Sacarose
A	34,72 ± 1,47 <sup>b,c</sup>	27,30 ± 1,57 <sup>e</sup>	62,02 ± 3,03 <sup>b,d</sup>	1,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,05 <sup>c</sup>	< LOQ
B	36,41 ± 1,61 <sup>c,d</sup>	29,26 ± 1,76 <sup>e,f</sup>	65,67 ± 3,36 <sup>c,d</sup>	1,24 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,05 <sup>d</sup>	< LOQ
C	40,19 ± 0,21 <sup>e,f</sup>	28,38 ± 0,57 <sup>e,f</sup>	68,57 ± 0,57 <sup>c</sup>	1,42 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,02 <sup>e</sup>	< LOQ
D	32,67 ± 0,40 <sup>b</sup>	23,91 ± 0,38 <sup>d</sup>	56,58 ± 0,78 <sup>b</sup>	1,37 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,02 <sup>c</sup>	< LOQ
E	28,03 ± 1,06 <sup>a</sup>	21,24 ± 0,57 <sup>c,d</sup>	49,27 ± 1,59 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>b,c</sup>	22,59 ± 1,20
F	39,37 ± 2,21 <sup>d,e</sup>	20,57 ± 1,56 <sup>b,c</sup>	59,94 ± 3,78 <sup>b,d</sup>	1,92 ± 0,32 <sup>b</sup>	0,86 ± 0,07 <sup>c</sup>	< LOQ
G	40,68 ± 0,49 <sup>e,f</sup>	30,74 ± 0,34 <sup>f</sup>	71,42 ± 0,81 <sup>c</sup>	1,32 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,01 <sup>d</sup>	< LOQ
H	39,23 ± 1,05 <sup>d,e</sup>	17,80 ± 1,68 <sup>b</sup>	57,03 ± 2,71 <sup>b</sup>	2,21 ± 0,30 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,06 <sup>b</sup>	< LOQ
I	50,24 ± 0,33 <sup>g</sup>	8,44 ± 0,34 <sup>a</sup>	58,67 ± 0,06 <sup>b</sup>	5,96 ± 2,22 <sup>c</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>a</sup>	< LOQ
J	42,88 ± 1,23 <sup>f</sup>	29,00 ± 0,63 <sup>e,f</sup>	71,88 ± 1,81 <sup>c</sup>	1,48 ± 2,49 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,03 <sup>d,e</sup>	< LOQ

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05). F+G – soma dos conteúdos de frutose e glicose; F/G – razão entre os conteúdos de frutose e glicose; G/U – razão entre glicose e umidade; LOQ – limite de quantificação (0,074 mg L<sup>-1</sup> sacarose) na curva de calibração. Letras de A-J = espécies de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1.

Fonte: próprio autor.

Os resultados encontrados para frutose e glicose foram de 28,03 (*Melipona marginata*) a 50,24% (m/m) (*Tetragona clavipes*) e 8,44 (*Tetragona clavipes*) a 30,74% (m/m) (*Melipona mondury*), respectivamente (Tabela 2.5). A frutose é o açúcar predominante no mel de abelhas sem ferrão (DE SOUSA et al., 2016), sendo responsável pela intensidade do sabor doce e a alta higroscopicidade, podendo manter o mel líquido por um longo período de estocagem ou até mesmo este nunca cristalizar (CRANE, 1985). Diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ), para frutose e glicose foram observadas.

Para os conteúdos de sacarose, apenas a amostra E (22,59% m/m) (*Melipona marginata*) apresentou valor superior ao limite de quantificação (LOQ) ( $0,074 \text{ mg L}^{-1}$ ) na curva de calibração. A quantidade de sacarose encontrada no mel, segundo a legislação brasileira para mel de *Apis mellífera* não pode ultrapassar  $6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  (BRASIL, 2000). Enquanto o *Codex Alimentarius* estipula o valor máximo de  $5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ . Quando elevados teores são encontrados estes sugerem uma colheita prematura, em que a sacarose ainda não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase, o que pode ser observado nos resultados obtidos para frutose e glicose, onde a amostra E apresenta conteúdos baixos destes açúcares (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Nas somas dos conteúdos de frutose e glicose, seis amostras (A, D, E, F, H e I) obtiveram valores inferiores a 65% (m/m), que é o conteúdo mínimo recomendado pela legislação de mel de *Apis mellífera* para açúcares redutores (BRASIL, 2000). Tal diferença pode ser devido a características físico-químicas próprias deste tipo de mel, como o elevado teor de umidade, ou até mesmo a presença de outros açúcares não estudados. Outros estudos realizados com méis de abelhas sem ferrão também relatam o baixo teor de açúcares redutores (SOUSA et al., 2013; RAMÓN-SIERRA; RUIZ-RUIZ; ORTIZ-VÁZQUEZ, 2015; DE SOUSA et al., 2016).

A razão de frutose e glicose (F/G) é um parâmetro utilizado na avaliação da tendência a cristalização do mel. Isto porque méis com alta razão F/G tendem a permanecer fluidos por mais tempo devido à maior solubilidade da frutose em água (KIRS et al., 2011; ESCUREDO et al., 2014).

Estudos têm mostrado que méis que não cristalizam, mesmo durante um longo período, têm razão F/G maior que 1,33, enquanto que aqueles com razão inferior a 1,11 cristalizam rapidamente (SMANALIEVA; SENGE, 2009; ESCUREDO et al., 2014). Para as

amostras de mel de abelhas sem ferrão *in natura* analisadas, todas apresentaram razões F/G superiores a 1,11, indicando fluidez e baixa tendência à cristalização. O maior valor encontrado foi para a amostra I (*Tetragona clavipes*), com razão F/G de 5,96, tornando-o, possivelmente, mais fluido por muito mais tempo.

Outro parâmetro que também tem sido apontado como indicador da taxa de cristalização é a razão glicose e umidade (G/U), sendo a cristalização do mel lenta ou nula quando a relação G/U é inferior a 1,7 e completa e rápida quando a relação é superior a 2 (DOBRE et al., 2012). De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras apresentaram índices inferiores a 1,7, evidenciando assim a fluidez das amostras. Além de F/G e G/U, vários fatores como poeira, grãos de pólen, agitação e bolhas de ar podem também influenciar no processo de cristalização (DOBRE et al., 2012).

Tais resultados também auxiliam na avaliação da vida de prateleira do produto, uma vez que a cristalização da glicose no mel proporciona uma diminuição dos sólidos solúveis, diluindo a solução amorfa e conseqüentemente aumentando a Aa nos méis. Desta forma, o alto conteúdo de Aa pode ocasionar fermentação com formação de álcool etílico e dióxido de carbono, o que prejudica a qualidade do mel (VENIR; SPAZIANI; MALTINI, 2010; ESCUREDO et al., 2013; TORNUK et al., 2013). Além do mais, do ponto de vista do consumidor, o estado de cristalização é a característica com maior impacto sobre a qualidade do mel, o que pode refletir negativamente na comercialização do produto (AL et al., 2009).

### 3.2 Compostos fenólicos e atividade antioxidante para méis *in natura*

Os resultados obtidos para compostos fenólicos totais e para atividade antioxidante (DPPH e FRAP) em méis de abelhas sem ferrão *in natura* são mostrados na Tabela 2.6.

Para o conteúdo de compostos fenólicos totais as amostras apresentaram valores entre 9,49 e 66,45 mg EAG 100g<sup>-1</sup> (Tabela 2.6), com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre elas, sendo o menor conteúdo encontrado na amostra J (*Melipona scutellaris*) e o maior conteúdo na amostra F (*Tetragonisca angustula*). Biluca (2014) ao caracterizar méis de abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina, também encontrou menor e maior conteúdo de compostos fenólicos totais nas mesmas espécies de abelhas, *Melipona scutellaris* e *Tetragonisca angustula*, que por sua vez eram de mesma localidade

(São Miguel do Oeste) e florada (Silvestre), porém coletados na safra de 2012. Reafirmando, desta forma, a influência majoritária da origem floral e localidade de coleta do néctar na concentração dos compostos fenólicos totais, uma vez que os resultados também demonstraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre amostras de mesma espécie de abelha, mas de origem floral e geográfica distintas (amostra A e B – *Melipona bicolor*) (SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010). Estudos com mel de *Apis mellifera* mostram resultados similares aos encontrados neste estudo, sendo reportados na literatura valores entre 6,60 e 62,7 (SILICI; SAGDI; EKICI, 2010; CAN et al., 2015; PETETTRO; COSSU; ALAMANNI, 2015).

Tabela 2.6 - Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão *in natura* (Meliponinae).

Amostra	Fenólicos totais (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )	DPPH (mg EAA 100 g <sup>-1</sup> )	FRAP (μmol Fe II 100 g <sup>-1</sup> )
A	23,71 ± 0,81 <sup>d</sup>	3,94 ± 0,20 <sup>c</sup>	147,55 ± 0,00 <sup>c</sup>
B	18,86 ± 0,35 <sup>b,c</sup>	3,00 ± 0,19 <sup>b</sup>	107,94 ± 0,15 <sup>b</sup>
C	37,24 ± 1,86 <sup>e</sup>	3,98 ± 0,13 <sup>c</sup>	224,84 ± 0,22 <sup>f</sup>
D	20,69 ± 0,78 <sup>c,d</sup>	6,47 ± 0,27 <sup>e</sup>	184,36 ± 0,40 <sup>e</sup>
E	15,99 ± 0,12 <sup>b</sup>	4,10 ± 0,25 <sup>c,d</sup>	160,29 ± 0,23 <sup>d</sup>
F	66,45 ± 1,45 <sup>h</sup>	30,77 ± 0,30 <sup>g</sup>	947,49 ± 3,56 <sup>j</sup>
G	22,08 ± 0,99 <sup>d</sup>	4,80 ± 0,29 <sup>d</sup>	233,97 ± 1,57 <sup>g</sup>
H	41,07 ± 0,65 <sup>f</sup>	8,96 ± 0,21 <sup>f</sup>	389,66 ± 2,72 <sup>h</sup>
I	46,47 ± 0,12 <sup>g</sup>	8,62 ± 0,22 <sup>f</sup>	421,35 ± 1,39 <sup>i</sup>
J	9,49 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,04 <sup>a</sup>	52,55 ± 1,18 <sup>a</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). EAG – equivalentes a ácido gálico; EAA – equivalentes a ácido ascórbico. Letras de A-J: espécies de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1.

Fonte: próprio autor

A atividade antioxidante nos méis de abelhas sem ferrão *in natura* foi analisada por duas metodologias diferentes (DPPH e FRAP), em virtude da falta de metodologia oficial em mel e também com o intuito de obter maior confiabilidade nos resultados. Ressalta-se a escassez de trabalhos na literatura que avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante em amostras de méis de abelhas sem ferrão. Entretanto, a literatura é muito vasta para mel de *Apis mellifera*, tornando assim possível a comparação com o presente estudo.

Resultados obtidos na análise de DPPH foram de 1,01 a 30,07 mg EAA 100g<sup>-1</sup>, sendo o menor valor encontrado na amostra J (*Melipona scutellaris*) e o maior na amostra F (*Tetragonisca angustula*), mesmas amostras que apresentaram menor e maior conteúdo de compostos fenólicos totais. Em estudo realizado por Silva e colaboradores (2013), com méis de *Melipona subnitida* produzidos no estado da Paraíba, são apresentados resultados para análise de DPPH com valores entre 10,6 a 12,9 mg EAA 100g<sup>-1</sup> necessários para reduzir 50% do radical, assim como Liberato e colaboradores (2013) encontraram valores para DPPH, também em amostras de méis de *Melipona subnitida*, em média 13,71 mg EAA 100g<sup>-1</sup>. Tais valores, encontrados neste estudo, apresentam-se bem próximos a aqueles obtidos em diversos estudos com méis de *Apis mellífera*, na ordem de 1,94 a 19,12 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> (ESCUREDO et al., 2013; MEINEN; CAMILLERI; ATTARD, 2014; HABIB et al., 2014).

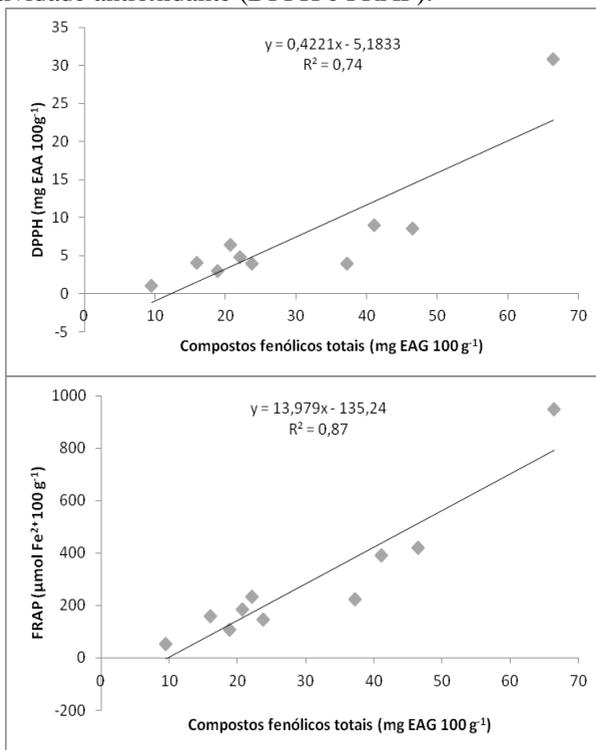
Para análise de FRAP em méis de abelhas sem ferrão *in natura* os resultados obtidos foram de 52,55 a 947,49 µmol Fe II 100g<sup>-1</sup>, onde todas as amostras apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). O menor e o maior valor encontrado foram novamente observados nas amostras J (*Melipona subnitida*) e F (*Tetragonisca angustula*), respectivamente. Para méis de *Apis mellífera* valores similares são relatados variando de 98,26 a 1257,59 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup> (PERNA et al., 2012; GAMBACORTA et al., 2014; HABIB et al., 2014; MONIRUZZAMAM et al., 2014).

Conforme observado nos resultados obtidos para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) nas amostras de mel de abelhas sem ferrão *in natura*, verifica-se que estes se apresentam similares aos resultados descritos na literatura para mel de *Apis mellífera*. Bem como, sofrem uma possível interferência, devido a fatores sazonais, ambientais, processamento e principalmente origem floral do néctar coletado, uma vez que as amostras apresentaram diferença estatisticamente significativa (BERTONCELJ et al., 2007; LACHMAN et al., 2010; ESCUREDO et al., 2013).

Destaca-se ainda, que uma correlação positiva linear forte e significativa ( $p < 0,05$ ) foi constatada, entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante (DPPH e FRAP), com valor de  $r^2$  igual a 0,74 e 0,87, respectivamente (Figura 2.1). Tais resultados corroboram com a hipótese de que os compostos fenólicos contribuem para a atividade antioxidante do mel. No entanto, outros compostos

bioativos existentes também podem ser capazes de influenciar na atividade antioxidante do produto (Can et al.,2015).

Figura 2.1 - Correlação obtida entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP).



### 3.3 Avaliação da umidade, pH e 5-HMF em méis após tratamentos térmicos recomendados pela legislação.

Tendo em vista que o mel de abelhas sem ferrão não possui uma legislação específica que regule sua cadeia produtiva, tratamentos térmicos recomendados pela legislação para mel de *Apis mellífera* foram aplicados nos méis de abelhas sem ferrão a fim de verificar seus efeitos, através da análise de alguns parâmetros de identidade e qualidade (umidade, pH e 5-HMF) antes e após tratamentos.

Quando os alimentos são submetidos a algum processamento térmico, estes estão sujeitos a alterações, principalmente quanto às

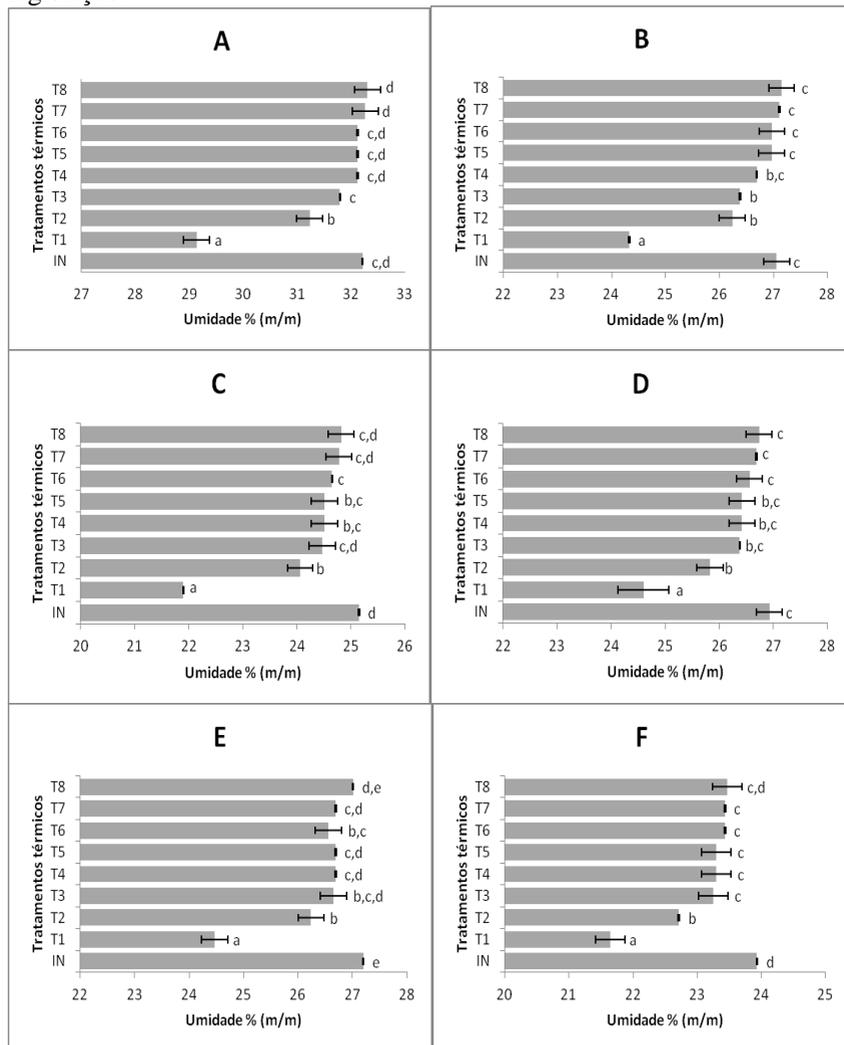
reações de escurecimento não enzimático. No caso do mel, a *reação de Maillard* pode ocorrer, o que é indesejável, devido ao processo de escurecimento e formação de 5-HMF e por isso os fatores que favorecem a aceleração desta reação devem ser estudados, tais como a umidade e o pH (ORDÓNEZ et al., 2005; DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010; ARAÚJO, 2011).

O mel de abelhas sem ferrão *in natura* possui teor de umidade elevado, e consequentemente elevada Aa, além do pH baixo (caráter ácido), fazendo com que a *reação de Maillard* ocorra de forma mais lenta. No entanto, ao aplicar o aquecimento, a tendência é a diminuição no teor de umidade, reduzindo Aa, e aumento do pH, o que pode propiciar uma aceleração na velocidade da *reação de Maillard*, uma vez que, para que a reação ocorra entre o açúcar redutor e o grupo amina é preciso que o par de elétrons do nitrogênio do aminoácido esteja livre, o que ocorre quando o pH é elevado, assim como para Aa, onde a taxa de escurecimento é baixa ou nula em valores de Aa elevada ou baixa, no entanto em condições de Aa intermediária (0,5 a 0,8) a taxa de escurecimento aumenta de forma rápida (ORDÓNEZ et al., 2005; DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010; ARAÚJO, 2011).

A *reação de Maillard* é indesejável em méis, pois promove uma diminuição do valor nutritivo, devido à destruição de aminoácidos essenciais e perda de ácido ascórbico e vitamina K, além de alterações na cor (escurecimento) e formação de 5-HMF, produto intermediário da *reação de Maillard* que tem demonstrado em diversos estudos ser mutagênico, cancerígeno e citotóxico (ORDÓNEZ et al., 2005; DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010; ARAÚJO, 2011; ISLAM et al., 2014). Além do mais, a alteração do pH e Aa podem favorecer o crescimento de micro-organismos deteriorantes (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

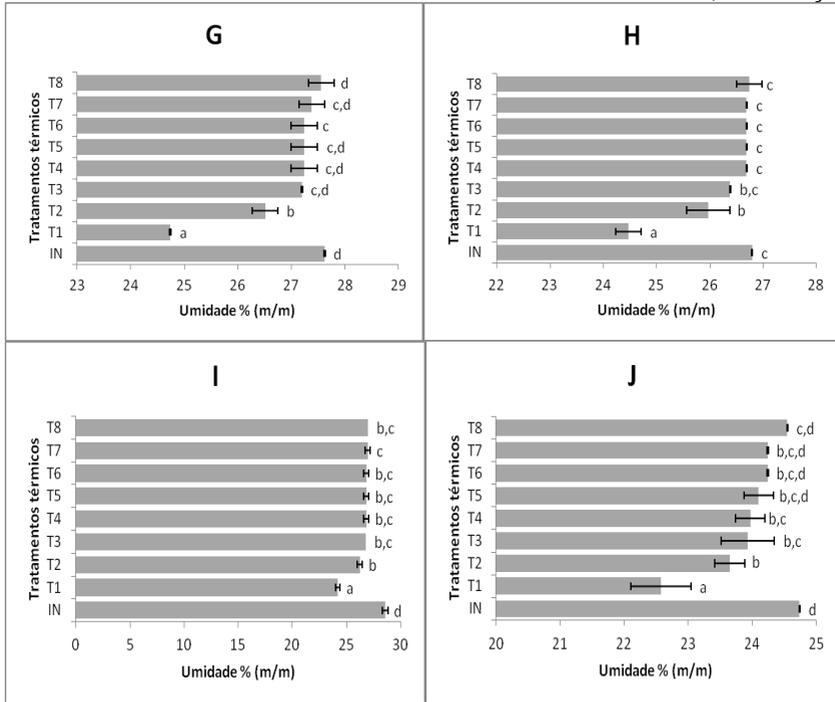
Os resultados obtidos para análise de umidade estão expostos na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Teores de umidade de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) submetidos aos tratamentos térmicos recomendados pela legislação.



(continua)

(continuação)



**Legenda:**

Amostras:

A = *Melipona bicolor*

B = *Melipona bicolor*

C = *Scaptotrigona bicunctata*

D = *Melipona quadrifasciata*

E = *Melipona marginata*

F = *Tetragonisca angustula*

G = *Melipona mondury*

H = *Nanotrigona testaceicornis*

I = *Tetragona clavipes*

J = *Melipona scutellaris*

Tratamentos térmicos:

T8 = 71,1°C/24s

T7 = 68°C/1,0min

T6 = 65,5°C/2,8min

T5 = 65,5°C/7,5min

T4 = 59,5°C/22min

T3 = 57°C/60min

T2 = 54,5°C/170min

T1 = 52°C/470min

IN = in natura

a,b,c,d,e Letras diferentes nas colunas de uma mesma amostra indicam diferenças significativas entre os tratamentos térmicos aplicados de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A partir dos resultados obtidos para umidade nas amostras de méis de abelhas sem ferrão submetidos aos tratamentos térmicos recomendados pela legislação, foi possível perceber que todas as amostras analisadas apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos T1 (52°C/470min) e T2 (54,5°C/170min) quando comparadas com *in natura*, apresentando redução dos teores, como pode ser visualizado na Figura 2.2. Tal variação pode ter sido ocasionada pelo fato da utilização de um sistema aberto, onde propicia a evaporação da água, atrelado às condições em que os méis foram submetidos, com longos períodos de aquecimento.

Nota-se também, a partir da Figura 2.2, que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) após aplicação de T8 (71,1°C) comparado a *in natura* para todas as amostras de méis analisadas, com exceção a amostra I (*Tetragona clavipes*) que diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

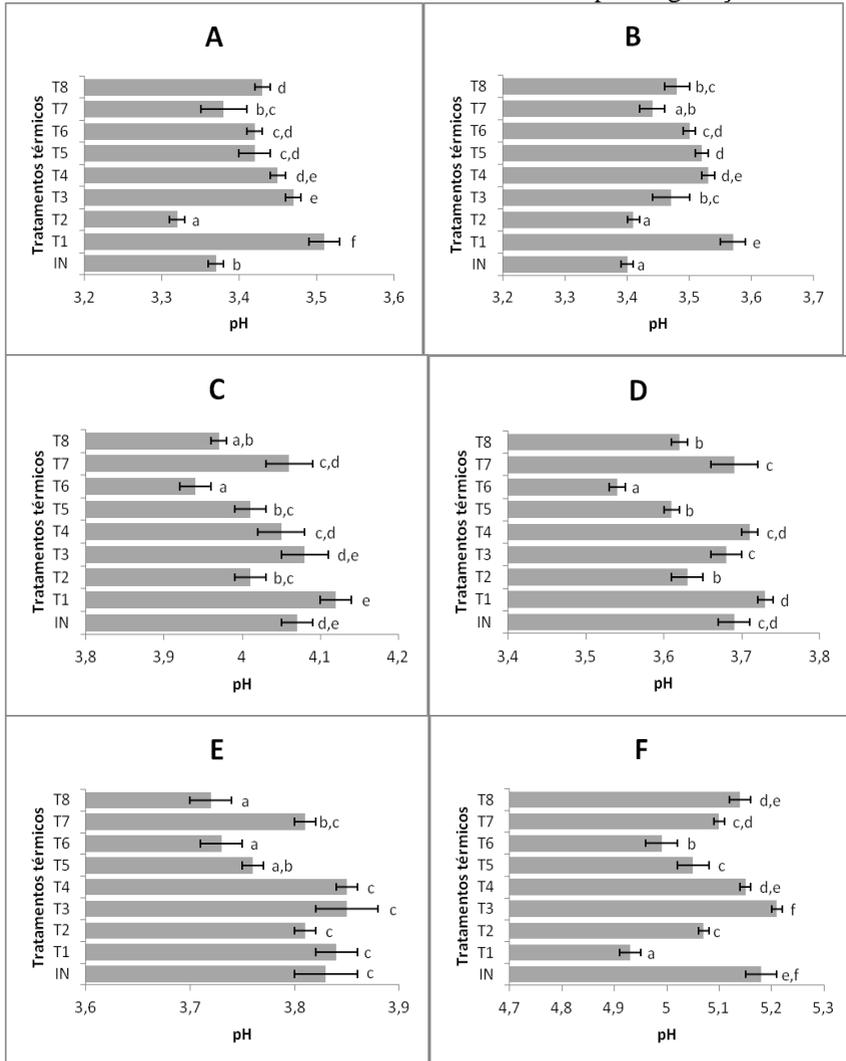
Em méis de *Apis mellifera* tais gradientes térmicos, recomendados pela legislação, são usualmente utilizados visando à diminuição de umidade, principalmente quando ela ultrapassa 20%, o limite máximo permitido pela legislação (VIEIRA, 2012). A redução de umidade acarreta na diminuição Aa, o que conseqüentemente acaba restringindo as chances de ocorrer à fermentação no mel, uma vez que reduz a água disponível para a proliferação de bolores e leveduras, causadores da fermentação (CRANE, 1987; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

No entanto, para méis de abelhas sem ferrão, apesar do elevado teor de umidade e conseqüentemente maior propensão à fermentação, a redução da umidade pode se tornar indesejável, quando tratamos a probabilidade de cristalização do mel, alterando características próprias e desejadas, como a fluidez, tão apreciada por seus consumidores.

Pode-se sugerir então, para o mel de abelhas sem ferrão, a utilização de um sistema fechado, que evite a evaporação da água, mas que mesmo assim consiga mantê-lo estável o máximo de tempo possível na prateleira.

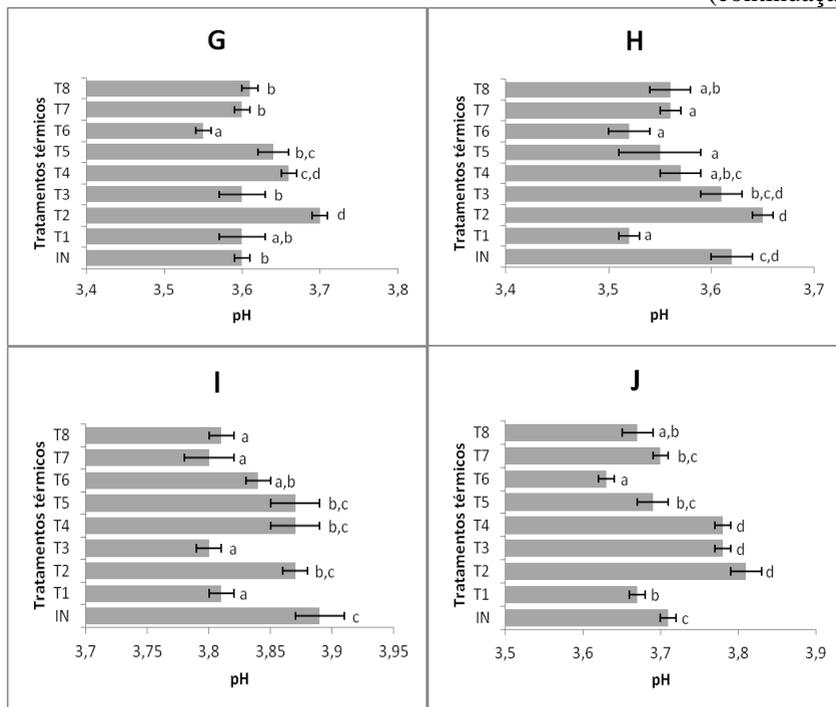
Os resultados obtidos para análise de pH, nas amostras submetidas as condições de tratamento sugeridas pela legislação, podem ser visualizados na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Valores de pH de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) submetidos aos tratamentos térmicos recomendados pela legislação.



(continua)

(continuação)

**Legenda:****Amostras:**A = *Melipona bicolor*B = *Melipona bicolor*C = *Scaptotrigona bicunctata*D = *Melipona quadrifasciata*E = *Melipona marginata*F = *Tetragonisca angustula*G = *Melipona mondury*H = *Nanotrigona testaceicornis*I = *Tetragona clavipes*J = *Melipona scutellaris***Tratamentos térmicos:**

T8 = 71,1°C/24s

T7 = 68°C/1,0min

T6 = 65,5°C/2,8min

T5 = 65,5°C/7,5min

T4 = 59,5°C/22min

T3 = 57°C/60min

T2 = 54,5°C/170min

T1 = 52°C/470min

IN = *in natura*

a,b,c,d,e Letras diferentes nas colunas de uma mesma amostra indicam diferenças significativas entre os tratamentos térmicos aplicados de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para os valores de pH obtidos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas após tratamento térmico daquelas *in natura*, com aumento e redução do valor. Na Figura 2.3 é possível visualizar que em praticamente todas as amostras analisadas houve redução do pH. No entanto, nota-se que a amostra A (*Melipona bicolor*) reduziu o pH somente após tratamento T2 (54,5°C/170min), a amostra B (*Melipona bicolor*) não obteve reduções de pH após aplicação dos tratamentos térmicos e a amostra G (*Melipona mondury*) apresentou redução somente após tratamento T6 (65,5°C/2,8min). Também se observa, a partir da Figura 2.3, que o pH foi elevado após aplicação dos tratamentos térmicos em apenas quatro amostras (A, B, G e J), onde as amostras A e B (*Melipona bicolor*), mostram um aumento nos valores de pH após aplicação de praticamente todos os tratamentos (T1, T3, T4, T5, T6 e T8), a amostra G (*Melipona mondury*) após T2 (54,5°C/170min) e T4 (59,5°C/22min) e a amostra J (*Melipona scutellaris*) após T2 (54,5°C/170min), T3 (57°C/60min) e T4 (59,5°C/22min).

Mesmo as amostras apresentando diferença significativa entre os tratamentos térmicos aplicados, foi possível verificar que os valores de pH estão na faixa de 3,32 a 5,21, mostrando que a característica ácida deste tipo de mel não foi alterada e que encontra-se ainda similar aos resultados obtidos por outros autores, para méis de abelhas sem ferrão *in natura* (HOLANDA OLIVEIRA; COSTA, 2012; SILVA et al., 2013; SOUSA et al., 2013).

Pelo fato do mel, de forma geral, conter naturalmente pH mais baixo (3,2 a 4,5) juntamente com Aa baixa, o desenvolvimento microbiano é inibido. No entanto, em méis de abelhas sem ferrão, a elevada umidade e consequente elevada Aa, em conjunto com pH baixo (3,2 a 4,5) pode tornar o mel mais suscetível a fermentação, devido a ação das leveduras, que tem pH ótimo de 4,5 a 6,5 e Aa mínima de 0,88 (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Como já mencionado, a redução da umidade no mel de abelhas sem ferrão é indesejável, portanto, como forma de minimizar o desenvolvimento das leveduras, que causam a fermentação, a redução do pH a níveis abaixo de 4,5 pode vir a ser um aliado na manutenção da vida de prateleira do produto.

O pH também pode intervir na *reação de Maillard* e consequentemente na formação de 5-HMF, conforme verificado por Chis e Purcărea (2011), que avaliaram a correlação entre a formação de 5-HMF e as alterações no pH de méis de castanha (*Apis mellifera*) da Romênia durante aplicação de tratamento térmico. Os autores

observaram decréscimos de pH, os quais dependem da temperatura aplicada, ou seja, quanto maior a temperatura de tratamento, mais expressivo se torna o efeito sobre o pH. Com a redução nestes valores, os autores atribuem o aumento de 5-HMF após tratamento térmico ao ambiente ácido. No entanto, para os méis de abelhas sem ferrão analisados, apesar dos tratamentos térmicos reduzirem os valores de pH quando comparados a amostra *in natura*, estes não interferiram na formação de 5-HMF após tratamento térmico.

Para análise de 5-HMF após aplicação dos tratamentos térmicos avaliados, em todas as amostras analisadas, os resultados obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação ( $0,31 \text{ mg L}^{-1}$ ) na curva de calibração.

A partir dos resultados obtidos para umidade e pH observa-se que apesar dos tratamentos térmicos aplicados terem reduzido o teor de umidade e modificado o pH das amostras, condições estas favoráveis no processo de aceleração da *reação de Maillard* e consequente formação de 5-HMF, o conteúdo de 5-HMF manteve-se inalterado independentemente do tratamento térmico aplicado. Desta forma, destaca-se a necessidade de um estudo completo, envolvendo outros parâmetros de identidade e qualidade, uma vez que a *reação de Maillard* pode ser influenciada por outros compostos e consequentemente a formação de 5-HMF, bem como a análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante, pois seus conteúdos também são afetados pelo tratamento térmico (KOWALSKI, 2013; ESCRICHE et al., 2014).

### 3.4 Parâmetros de identidade e qualidade em méis após tratamento térmico

Após a obtenção dos resultados do item 3.3, buscando avaliar a possível interferência dos tratamentos térmicos recomendados pela legislação de *Apis mellifera* em outros parâmetros de identidade e qualidade, tais como sólidos solúveis, condutividade elétrica, acidez livre, diastase e açúcares, três amostras de mel de abelhas sem ferrão foram selecionadas, levando-se em conta o conteúdo de umidade, principal característica capaz de influenciar na maturidade, viscosidade, peso específico, cristalização, vida de prateleira, características sensoriais e valor comercial. As amostras A (*Melipona bicolor*) e F (*Tetragonisca angustula*) foram escolhidas por possuírem maior e menor teor de umidade (32,22 e 23,93% m/m, respectivamente), assim

como a amostra G (*Melipona mondury*), por ter valor médio (27,62% m/m).

Dois tratamentos térmicos também foram selecionados para este estudo: T1 (52°C/470min) e T8 (71,1°C/24s). A escolha destes tratamentos levou em conta os resultados obtidos no item 3.3, principalmente para o parâmetro umidade, uma vez que o pH não foi influenciado, como visto anteriormente, por um tratamento térmico específico, destacando-se a manutenção de pH abaixo de 4,5 - condição ideal para evitar o desenvolvimento de leveduras, causadoras de fermentação no mel - independentemente do tratamento térmico aplicado. Desta forma, os tratamentos foram selecionados, uma vez que T1 (52°C/470min) diferiu significativamente em todas as amostras analisadas, reduzindo os teores de umidade. E T8 (71,1°C/24s) foi o tratamento que manteve a umidade semelhante a amostra *in natura* em praticamente todas as amostras analisadas. Neste contexto, buscou-se verificar se a redução da umidade, ocasionada por T1, poderá resultar em alterações nos demais parâmetros de identidade e qualidade, assim como se o tratamento T8 (que manteve a umidade) irá também manter os demais parâmetros nas amostras selecionadas.

A Tabela 2.7 apresenta os resultados obtidos para análise de umidade, condutividade elétrica, acidez livre e pH, ambas para as amostras de méis *in natura* selecionadas, bem como após aplicação dos tratamentos térmicos selecionados serem aplicados nas mesmas.

Tabela 2.7 - Características físico-químicas determinadas nos méis de abelhas sem ferrão (Meliponinae) *in natura* e após tratamentos térmicos.

<b>Sólidos solúveis (°Brix)</b>			
<b>Amostras</b>	<b><i>in natura</i></b>	<b>52°C/470min</b>	<b>71,1°C/24s</b>
<b>A</b>	67,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	71,90 ± 0,40 <sup>b</sup>	66,80 ± 0,23 <sup>a</sup>
<b>F</b>	75,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	76,60 ± 0,23 <sup>b</sup>	75,30 ± 0,52 <sup>a</sup>
<b>G</b>	72,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	73,60 ± 0,17 <sup>c</sup>	71,30 ± 0,29 <sup>a</sup>
<b>Condutividade elétrica (mS cm<sup>-1</sup>)</b>			
<b>A</b>	0,19 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>F</b>	0,60 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,51 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>G</b>	0,28 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Acidez livre (mEq kg<sup>-1</sup>)</b>			
<b>A</b>	32,08 ± 0,89 <sup>a</sup>	31,40 ± 1,62 <sup>a</sup>	35,57 ± 1,04 <sup>a</sup>
<b>F</b>	23,17 ± 0,21 <sup>b</sup>	23,30 ± 0,01 <sup>b</sup>	21,31 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>G</b>	33,31 ± 1,37 <sup>a</sup>	32,51 ± 1,41 <sup>a</sup>	35,28 ± 2,01 <sup>a</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos térmicos aplicados de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Amostras: A = *Melipona bicolor*, F = *Tetragonisca angustula* e G = *Melipona mondury*.

Fonte: próprio autor

Para os conteúdos de sólidos solúveis (Tabela 2.7) foi possível observar que após tratamento térmico T1 (52°C/470min) aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ). Comportamento que pode ser justificado com o fato de que tais amostras reduziram significativamente seus teores de umidade após serem submetidas ao mesmo tratamento (T1: 52°C/470min), o que pode ter contribuído para uma concentração destes compostos.

Os resultados de condutividade elétrica (Tabela 2.7) mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos térmicos aplicados para todas as amostras, apresentando diminuição dos valores quando comparados com as amostras *in natura*. Como a condutividade elétrica, além de estar relacionada com o teor de minerais, que não são afetados pelo tratamento térmico, ela também tem relação com a presença de ácidos orgânicos e proteínas (YÜCEL; SULTANOĞLU, 2013), por isso a diminuição nos valores podem ter sido ocasionadas por perdas de alguns destes compostos, decorrentes do aquecimento.

Para análise de acidez livre (Tabela 2.7) as amostras A (*Melipona bicolor*) e G (*Melipona mondury*) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos térmicos aplicados em comparação com as amostras *in natura*. Também é possível observar

que os valores de acidez, para estas mesmas amostras, diminuíram para T1 (52°C/470min) e aumentaram para T8 (71,1°C/24s) em relação à amostra *in natura*. A diminuição do conteúdo de acidez, ocorrida em T1, pode ser explicada pela provável volatilização de ácidos orgânicos presentes, considerando o tempo de aquecimento (52°C/470min) (JURADO-SÁNCHEZ; BALLESTEROS; GALLEGO, 2011)

Fallico e colaboradores (2004) ao aplicar tratamento térmico em méis de *Apis mellifera* visualizaram aumento do conteúdo de acidez livre em função da elevação da temperatura. Tais resultados também foram observados no presente estudo para as amostras A e G.

Quando avaliamos a amostra F (*Tetragonisca angustula*) observamos diferença estatisticamente significativa somente para o tratamento T8 (71,1°C/24s) em comparação com a amostra *in natura*. Os valores de acidez livre encontrados mostraram-se contrários ao observado para as amostras A (*Melipona bicolor*) e G (*Melipona mondury*), apresentando-se superior em T1 (52°C/470min) e inferior em T8 (71,1°C/24s), em comparação com a amostra *in natura*.

Semelhante ao 5-HMF, a atividade diastásica pode ser utilizada como indicativo de envelhecimento e aumento de temperatura do mel, pois a atividade diastásica pode ser reduzida ao longo do armazenamento ou quando o produto é submetido ao aquecimento acima de 60°C ou aquecimentos brandos por longos períodos (GOMES et al., 2010; YÜCEL; SULTANOĞLU, 2013). Nas amostras analisadas pode ser observado que os tratamentos térmicos não influenciaram na atividade diastásica, onde as amostras A (*Melipona bicolor*) e G (*Melipona mondury*) apresentaram resultados menores que 3 un. Göthe tanto na amostra *in natura* quanto naquelas após aplicação dos tratamentos térmicos. Apenas a amostra F (*Tetragonisca angustula*) *in natura* apresentou 46,13 un. Göthe, sendo que após aplicação dos tratamentos térmicos foi verificado uma redução do índice diastásico para 38,85 un. Göthe em T1 (52°C/470min) e 42,53 un. Göthe em T8 (71,1°C/24s), porém tal diferença não foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 2.8 traz os resultados obtidos para os conteúdos de frutose, glicose e sacarose, soma de frutose e glicose (F+G), bem como a razão frutose/glicose (F/G) e glicose/umidade (G/U) nos méis *in natura* e submetidos aos tratamentos térmicos selecionados.

Tabela 2.8 - Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose, sacarose encontrados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão *in natura* (Meliponinae) e após tratamentos térmicos.

Amostras	<i>in natura</i>	Frutose	
		52°C/470min	71,1°C/24s
A	34,72 ± 1,47 <sup>b</sup>	37,62 ± 1,86 <sup>c</sup>	26,73 ± 0,38 <sup>a</sup>
F	39,37 ± 2,21 <sup>a</sup>	42,47 ± 0,50 <sup>a</sup>	42,39 ± 0,34 <sup>a</sup>
G	40,68 ± 0,49 <sup>b</sup>	39,10 ± 0,53 <sup>a</sup>	40,56 ± 0,73 <sup>a,b</sup>
Glicose			
A	27,30 ± 1,56 <sup>b</sup>	29,16 ± 0,96 <sup>b</sup>	20,80 ± 0,38 <sup>a</sup>
F	20,57 ± 0,34 <sup>a</sup>	22,29 ± 0,54 <sup>a,b</sup>	23,07 ± 0,29 <sup>b</sup>
G	30,74 ± 1,57 <sup>a,b</sup>	29,57 ± 0,59 <sup>a</sup>	31,17 ± 0,66 <sup>b</sup>
F+G			
A	62,02 ± 3,03 <sup>b</sup>	67,48 ± 2,13 <sup>b</sup>	47,52 ± 0,75 <sup>a</sup>
F	59,94 ± 3,78 <sup>a</sup>	65,43 ± 1,03 <sup>a</sup>	65,45 ± 0,63 <sup>a</sup>
G	71,42 ± 0,81 <sup>a</sup>	68,67 ± 1,12 <sup>a,b</sup>	71,73 ± 1,39 <sup>b</sup>
F/G			
A	1,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,02 <sup>a</sup>
F	1,92 ± 0,32 <sup>b</sup>	1,85 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,32 <sup>a</sup>
G	1,32 ± 0,35 <sup>b</sup>	1,32 ± 0,30 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,02 <sup>a</sup>
G/U			
A	0,85 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,65 ± 0,02 <sup>a</sup>
F	0,86 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,03 <sup>b</sup>
G	1,11 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,14 ± 0,04 <sup>a</sup>
Sacarose			
A	< LOQ	< LOQ	< LOQ
F	< LOQ	< LOQ	< LOQ
G	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos térmicos aplicados de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). LOQ – limite de quantificação (0,074 mg L<sup>-1</sup> sacarose) na curva de calibração. Amostras: A = *Melipona bicolor*, F = *Tetragonisca angustula* e G = *Melipona mondury*.

Fonte: próprio autor

Variações nos conteúdos de frutose e glicose foram observadas nas amostras após estas serem submetidas aos tratamentos térmicos (52°C/470min e 71,1°C/24s). No entanto, somente a amostra A (*Melipona bicolor*) apresentou aumento estatisticamente significativo no conteúdo de frutose após tratamento T1 (52°C/470min) quando comparado a *in natura*.

A elevação do conteúdo destes compostos (frutose e glicose) pode estar associada a uma possível hidrólise enzimática de certos dissacarídeos e trissacarídeos a monossacarídeos, uma vez que a temperatura e tempo utilizados são capazes de ativar as enzimas responsáveis pela hidrólise da sacarose e a maltotriose, por exemplo.

A sacarose, formada por uma molécula de frutose e uma molécula de glicose por meio de ligação  $\alpha$ -1-4, é hidrolisada pela enzima invertase, que tem temperatura máxima de ativação em 60°C, o que origina uma mistura equimolar de hexoses. Já a maltotriose, formada por três unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, é hidrolisada através de enzimas à maltose. A maltose, que também é hidrolisada por enzimas, mas neste caso pela enzima  $\alpha$ -glicosidase (temperatura de ativação máxima de 65°C), origina duas moléculas de glicose (KAMAL; KLEIN, 2011; SOLDATKIN et al., 2013). Além disso, o fato da redução da umidade nas amostras, após os tratamentos térmicos, pode ter influenciado em resultados mais elevados no conteúdo de frutose e glicose, uma vez que a redução da água pode acarretar em uma concentração de tais compostos.

Outro fato que pode ser observado nos resultados obtidos é que a amostra A (*Melipona bicolor*) após ser submetida ao tratamento T8 (71,1°C/24s) diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) as concentrações de frutose e glicose, diferentemente das outras amostras (F e G) onde mantiveram seus conteúdos próximos a *in natura*. Tais resultados podem estar relacionados com a degradação que as pentoses e hexoses sofrem após aquecimento.

Nas somas dos conteúdos de frutose e glicose nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para as amostras após o tratamento térmico, exceto a amostra A (*Melipona bicolor*), que após o tratamento T8 (71,1°C/24s) reduziu seu conteúdo. Tal fato ocorreu devido as reduções de frutose e glicose, observadas anteriormente para esta mesma amostra neste mesmo tratamento.

Para os conteúdos de sacarose, todas as amostras em todos os tratamentos térmicos apresentaram valores abaixo do LOQ (0,074 mg L<sup>-1</sup>) na curva de calibração.

A razão F/G, como já mencionado anteriormente, é utilizada para avaliar a cristalização do mel, devido à menor solubilidade da glicose em água em relação à frutose, assim como a relação de G/U. Apesar dos resultados obtidos apresentarem diferença estatisticamente significativa e para algumas amostras a razão F/G ter sido menor em comparação

com *in natura*, os méis analisados permaneceram com F/G acima ou igual a 1,3, assim como para G/U onde todas as amostras apresentaram valores inferiores a 1,7, garantindo sua fluidez por um longo período sem que ocorra a cristalização (SMANALIEVA; SENGE, 2009; DOBRE et al., 2012; ESCUREDO et al., 2014).

### 3.5 Compostos fenólicos e atividade antioxidante em méis após tratamento térmico

Além dos parâmetros de identidade e qualidade, os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante também foram analisados nos méis e tratamentos térmicos anteriormente selecionados (item 3.4): amostras A (*Melipona bicolor*), F (*Tetragonisca angustula*) e G (*Melipona bicolor*) e tratamentos térmicos T1 (52°C/470min) e T8 (71,1°C/24s). Os compostos fenólicos, assim como outros compostos orgânicos, sofrem degradação dependendo das condições ambientais a que são submetidos, o que pode influenciar na atividade antioxidante e por isso se faz necessário o estudo dos possíveis efeitos do aquecimento sobre estes conteúdos.

Os resultados obtidos para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP), nas amostras de méis de abelhas sem ferrão *in natura* e após tratamentos térmicos são apresentados na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 - Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão *in natura* (Meliponinae) e após tratamentos térmicos.

Fenólicos totais (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )			
Amostras	<i>in natura</i>	52°C/470min	71,1°C/24s
A	23,71 ± 0,81 <sup>a</sup>	24,55 ± 0,23 <sup>a</sup>	23,53 ± 0,24 <sup>a</sup>
F	66,45 ± 1,45 <sup>a</sup>	74,19 ± 1,40 <sup>a</sup>	70,83 ± 4,84 <sup>a</sup>
G	22,08 ± 0,99 <sup>a</sup>	24,83 ± 0,35 <sup>a</sup>	22,23 ± 2,23 <sup>a</sup>
DPPH (mg EAA 100 g <sup>-1</sup> )			
A	3,94 ± 0,20 <sup>a</sup>	5,30 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,50 ± 0,29 <sup>a</sup>
F	30,77 ± 0,30 <sup>b</sup>	31,90 ± 0,31 <sup>b</sup>	27,51 ± 1,32 <sup>a</sup>
G	4,80 ± 0,29 <sup>a,b</sup>	5,20 ± 0,44 <sup>b</sup>	4,28 ± 0,07 <sup>a</sup>
FRAP (µmol Fe II 100 g <sup>-1</sup> )			
A	147,55 ± 0,00 <sup>b</sup>	137,46 ± 1,39 <sup>a</sup>	139,84 ± 0,28 <sup>a</sup>
F	947,49 ± 3,56 <sup>c</sup>	899,21 ± 4,45 <sup>b</sup>	814,82 ± 2,93 <sup>a</sup>
G	233,97 ± 1,57 <sup>c</sup>	159,88 ± 2,66 <sup>b</sup>	148,23 ± 1,39 <sup>a</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos térmicos aplicados de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). EAG – equivalentes a ácido gálico; EAA – equivalentes a ácido ascórbico. Amostras: A = *Melipona bicolor*, F = *Tetragonisca angustula* e G = *Melipona mondury*.  
Fonte: próprio autor.

Para o conteúdo de compostos fenólicos totais os tratamentos térmicos não diferiram entre si ( $p < 0,05$ ), ou seja, mesmo as amostras sendo submetidas a diferentes condições térmicas seu conteúdo não foi afetado. No entanto, um aumento nos teores foi observado em todas as amostras após tratamento T1 (52°C/470min). Kowalski (2013) avaliou as mudanças na atividade antioxidante em mel de *Apis mellífera* durante processamento térmico, o qual também verificou um aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais, o que refletiu em um aumento do potencial antioxidante.

No presente estudo, o DPPH mostrou dados superiores em T1 (52°C/470min) quando comparados às amostras *in natura*, mostrando-se similar aos resultados obtidos por Kowalski (2013). No tratamento T8 (71,1°C/24s), apenas a amostra F (*Tetragonisca angustula*) apresentou diferença estatística significativa quando comparado à amostra *in natura*, mostrando redução nos teores.

Para análise de FRAP, os tratamentos térmicos aplicados mostraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), em todas as amostras analisadas, comparando-se com as amostras *in natura*. Os dados obtidos também mostraram uma redução nos valores quando utilizado

tratamento T8 (71,1°C/24s) para as amostras F (*Tetragonisca angustula*) e G (*Melipona scutellaris*).

Desta forma, é importante ressaltar que os tratamentos térmicos aplicados para as amostras de méis de abelhas sem ferrão analisadas, não alteraram de forma significativa os conteúdos de compostos fenólicos totais e DPPH. Apesar de serem observados aumentos em tais teores, após a aplicação do tratamento T1 (52°C/470 min), estes não foram estatisticamente significativos.

Possíveis aumentos da atividade antioxidante após processo de aquecimento pode ser atribuído à complexidade das reações de escurecimento não enzimático que envolve diferentes compostos e prossegue através de diferentes processos químicos, dependendo da composição do produto e condições de processamento. Este comportamento pode ser também consequência da formação de compostos com atividade antioxidante diferente em várias fases das reações de *Maillard*, dependendo das temperaturas de tratamento, bem como a concentração dos compostos devido à redução da água (MANZOCCO et al., 2000; TURKMEN et al., 2006).

#### 4 CONCLUSÃO

A caracterização dos méis de abelhas sem ferrão *in natura* demonstrou diferença entre as amostras analisadas, apresentando também características distintas dos méis de abelhas *Apis mellifera* apresentadas na literatura. Tal fato evidencia a necessidade de elaboração de uma regulamentação específica para o produto mel de abelhas sem ferrão. A aplicação dos tratamentos térmicos recomendados pela legislação do mel de *Apis mellifera* contribuíram na manutenção das características físico-químicas do mel de abelhas sem ferrão, ressaltando a preservação dos conteúdos de 5-HMF, diastase, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante DPPH. No entanto, devido ao fato de que independente dos tratamentos térmicos aplicados, as amostras mantiveram seus conteúdos, a utilização de uma temperatura elevada com menor tempo de processo poderia ser mais adequada, levando em consideração a viabilidade, condições operacionais e custos.

Neste contexto, verifica-se também a necessidade de estudos mais aprofundados na investigação de tratamentos térmicos que garantam a qualidade microbiológica do produto, na perspectiva do aumento de vida de prateleira.



### **CAPÍTULO 3**

## **ESTABILIDADE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE MEL DE GUARAÍPO (*Melipona bicolor*) APÓS TRATAMENTOS TÉRMICOS COM ELEVADA TEMPERATURA E CURTO TEMPO DE PROCESSAMENTO**



## RESUMO

Neste estudo, tratamentos térmicos utilizando temperatura elevada e curto tempo de processamento foram aplicados em mel de abelha sem ferrão (abelha guaraiipo), a fim de verificar seus efeitos e assim determinar as melhores condições de tratamento, onde suas características químicas sejam mantidas próximo a *in natura*, assim como a eliminação de carga microbiana existente. Desta forma, amostras de mel de guaraiipo (*Melipona bicolor*), coletadas em Santa Rosa de Lima-SC foram submetidas aos tratamentos térmicos e avaliadas por meio dos parâmetros de identidade e qualidade (umidade, condutividade elétrica, acidez livre, pH, 5-hidroximetilfurfural, diastase, frutose, glicose e sacarose), compostos fenólicos (totais e identificação) e atividade antioxidante e redutora (DPPH e FRAP). Também verificou-se a eficiência do tratamento térmico em reduzir a carga microbiana existente no mel, através da análise de coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e *Salmonella* spp. Os resultados mostraram que a aplicação de 90°C por 60s (ensaio 2) foi o tratamento que manteve as características próximas a amostra *in natura*, em todos os parâmetros de identidade e qualidade, não diferindo estatisticamente da amostra *in natura*. Também foi possível constatar que o mel de abelhas sem ferrão possui resistência a formação de 5-hidroximetilfufural (indicativo de deterioração) após tratamento térmico, obtendo-se < LOQ (0,31 mg L<sup>-1</sup>) nas amostras estudadas. Quanto aos compostos fenólicos totais e atividade e redutora (FRAP), estes demonstraram incrementos nos seus conteúdos após aplicação dos tratamentos térmicos, provavelmente devido a dissociação destes compostos em função do aquecimento. Quanto a identificação de compostos fenólicos, foram detectados 11 compostos, sendo todos preservados mesmo após os tratamentos térmicos. Na avaliação da estabilidade microbiológica, os tratamentos térmicos foram capazes de eliminar bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. Deste modo, conclui-se que o tratamento térmico pode ser aplicado, sem que acarrete em modificações químicas ao produto, principalmente quanto ao 5-HMF e compostos fenólicos identificados. Bem como a garantia da segurança e qualidade do produto em virtude da eliminação dos micro-organismos.

**Palavras-chave:** Mel. Quaraipo. Tratamento térmico. Compostos fenólicos. Microbiologia.



## 1 INTRODUÇÃO

A abelha guaraiipo (*Melipona bicolor*) é uma espécie de abelha sem ferrão comumente encontrada nas regiões Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e Sudeste (Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo) do Brasil. Apesar destas abelhas serem eussociais, assim como *Apis mellífera* e pertencerem a mesma família (Apidae), elas são de uma subfamília diferente, a *Meliponinae*, a qual apresenta diversos gêneros, variações na morfologia, hábitos de nidificação, comportamento e ecologia, além da coleta de néctar de plantas rasteiras, revoadas curtas na procura de alimentos, colmeias no sentido horizontal e sem elaboração de favos para a reserva de alimentos (CARVALHO, 2005). Devido a tais particularidades, o mel produzido por estas abelhas apresenta características físico-químicas distintas, como a umidade elevada, menor conteúdo de açúcares redutores e maior acidez, refletindo em um mel menos adocicado e mais fluido, podendo este permanecer por um longo período de tempo sem cristalizar (DE SOUSA et al., 2016; VIT; PEDRO; ROUBIK., 2013; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Atualmente, o mel das abelhas sem ferrão tem ganhado destaque, pois além das características sensoriais inigualáveis, que têm atraído a atenção como produto *gourmet*, suas propriedades medicinais têm sido descritas em algumas literaturas e também pela cultura popular como sendo antiséptico, antimicrobiano e anti-inflamatório (SILVA et al., 2013). Com o crescente interesse da população por este mel, surge à necessidade de padrões de identidade e qualidade específicos, uma vez que a legislação atual é para mel de *Apis mellífera*, bem como a manutenção das suas características durante a vida de prateleira.

Sua principal característica, a textura mais fluida, deriva do elevado conteúdo de umidade, que pode ser responsável pela ocorrência da fermentação indesejável, causada por leveduras pertencentes à microbiota do próprio néctar ou introduzida pelos manipuladores do apiário. Esta fermentação pode modificar o sabor e a cor, que resulta da formação de compostos orgânicos, refletindo em uma diminuição da vida de prateleira (ABRAMOVIC et al., 2008).

Dentre as técnicas de conservação que estão sendo estudadas e aplicadas para o mel de abelhas sem ferrão, o tratamento térmico ganha destaque por apresentar-se como um método prático para a prevenção ou atraso da cristalização e na destruição de micro-organismos (TOSI et al., 2004; TURHAN et al., 2008). Segundo estudo realizado por Tosi e

colaboradores (2004), onde foram avaliados os efeitos da alta temperatura e curto tempo sobre a qualidade, cristalização e inibição de fungos no mel de *Apis mellifera*, este demonstrou que nestas condições todos os bolores e leveduras analisados são completamente inibidos, e que mesmo a utilização de temperatura elevada, a realização do tratamento por um curto espaço de tempo pode não causar efeitos prejudiciais à qualidade do mel, com relação a 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e diastase.

Para méis de abelhas sem ferrão são escassos os estudos que aplicam tratamento térmico e avaliam seus efeitos sobre a composição. Biluca e colaboradores (2014) recentemente realizaram tal estudo, no entanto somente os parâmetros açúcares e 5-HMF foram avaliados. Os autores verificaram que o mel de abelhas sem ferrão possui possível resistência à formação de 5-HMF, provavelmente devido as suas características, como o predomínio de frutose, elevada Aa e acidez. Desta forma, a utilização de tratamento térmico nestes méis poderia estender a vida de prateleira sem prejuízos da sua qualidade.

No entanto, outros compostos, tais como os compostos fenólicos também podem sofrer degradação dependendo das condições a que são submetidos. A manutenção destes compostos é importante devido a sua atividade antioxidante, que é capaz de neutralizar ou sequestrar os radicais livres, além da quelação de metais de transição, de forma a prevenir diversas doenças cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (CAN et al., 2015; SILVA et al., 2013).

Em virtude disto, o objetivo deste capítulo foi aplicar temperaturas elevadas com rápido tempo de processamento, na busca pela estabilidade química, verificando parâmetros de identidade e qualidade, avaliação de compostos fenólicos (totais e identificação) e atividade antioxidante e redutora, bem como a redução de micro-organismos, causadores de fermentação e deterioração do mel.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Para realização das análises foram utilizados os reagentes: tetraborato de sódio (TBS), dodecil-sulfato de sódio (SDS), brometo de cetil-trimetil-amônio (CTBA), ácido sórbico, cafeína, Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

(DPPH) e 5-hidroximetilfulfural (5-HMF) foram obtidos da Sigma Aldrich (Santa Ana, E.U.A).

Os reagentes, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, cloreto de sódio, acetato de sódio, amido solúvel, fosfato monossódico heptahidratado, iodo, ácido ascórbico, cloreto férrico, sulfato ferroso, ácido gálico, carbonato de sódio, frutose, glicose, sacarose e o solvente metanol, foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água utilizada foi filtrada por sistema de desionização (deionizador Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA).

Os principais instrumentos utilizados foram: refratômetro Abbe Tropenmodell I (Carl Zeiss, Alemanha), termômetro digital, condutivímetro Tec-4MP (Tecnal, Brasil), pHmetro DM-20 (Digimed, Brasil), espectrofotômetro modelo SB 1810-S (Spectro Visium, Brasil), eletroforese capilar modelo 7100 (Agilent Technologies, EUA), banho termostatizado modelo 550 (Fisatom, Brasil), ultrassom (Cristófoli, Brasil), centrífuga MiniSpin plus (Eppendorff, Alemanha), vortex 772 (Fisatom, Brasil), balança analítica AB204-S (Mettler Toledo, Suíça), purificador de água Simplicity UV (sistema Milli - Q, Millipore, EUA), Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1200 (Agilent Technologies, Alemanha), espectrômetro de massas modelo Q Trap 3200 (Applied Biosystems, Canadá). O *software* HP ChemStation, Analyst e Statistic 7.0 (Statsoft Inc., EUA) foram utilizados para aquisição de dados e tratamento.

## 2.2 Amostras

Uma mistura de amostras de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*), com características físico-químicas semelhantes (tais como umidade e acidez), obtidas através de parceria com meliponicultores do município de Santa Rosa de Lima, no estado de Santa Catarina, foi utilizada para o estudo. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas em frascos de polipropileno do tipo falcon, ao abrigo da luz, e sob refrigeração (gelo) e transportadas até o Laboratório de Química de Alimentos do CCA – UFSC, onde posteriormente foram misturadas em frasco de vidro, sendo então a *blend* mantida a temperatura de  $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

## 2.3 Parâmetros de Identidade e Qualidade

Para realização das análises as amostras foram preparadas em triplicatas. A descrição completa dos métodos utilizados está no item 2.3 do Capítulo 2 deste trabalho.

O conteúdo de umidade foi determinado por refratometria à temperatura ambiente usando um refratômetro de Abbé. Os resultados foram expressos em % (m/m) (Wedmore, 1955).

Os sólidos solúveis (°Brix) foram determinados na mesma condição analítica citada acima através de leitura no refratômetro de Abbé, em temperatura ambiente, segundo a AOAC (2005).

A determinação de acidez foi realizada segundo AOAC (2005) e os valores foram expressos em mEq kg<sup>-1</sup>.

Os açúcares, frutose, glicose e sacarose foram determinados segundo Rizelio e colaboradores (2012a) através do método indireto de eletroforese capilar, sendo os resultados expressos em % m/m.

A atividade diastásica foi determinada de acordo com o método n° 7.7 descrito pelo *Codex Alimentarius Commission* e expressa em un. Göthe (CAC, 1990).

O conteúdo de 5-HMF foi determinado segundo método descrito por Rizelio e colaboradores (2012b), utilizando eletroforese capilar através do método de MEKC e expresso em mg kg<sup>-1</sup>.

A condutividade elétrica foi determinada em solução de mel a 20% (m/v) em água desionizada, a 25°C, com auxílio de condutivímetro. Os resultados foram obtidos diretamente no equipamento e expressos em mS cm<sup>-1</sup> (BOGDANOV, 1999).

A determinação de pH foi realizada em solução de mel a 20% (m/v) em água desionizada, a 25°C, com auxílio de pHmetro (AOAC, 2005).

## 2.4 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Para avaliar o conteúdo de compostos fenólicos totais foi aplicado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente a ácido gálico (mg EAG) em 100 g<sup>-1</sup> de mel.

A atividade antioxidante, referente às substâncias presentes nos méis foi quantificada através de dois métodos baseados em diferentes princípios e condições experimentais: o método de sequestro de radicais do DPPH, de acordo com Brand-Williams, Couverlier e Berset (1995),

onde os resultados foram expressos em miligramas equivalentes a ácido ascórbico (mg EAA) em 100 g<sup>-1</sup> de mel e o método do poder redutor FRAP, descrito por Benzie e Strain (1996), modificado por Bertonecelj e colaboradores (2007), com valores expressos em μmols equivalentes a Fe (II) em 100 g<sup>-1</sup> de mel.

## 2.5 Identificação dos compostos fenólicos

A extração dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com Trautvetter, Koelling-Speer e Karl Speer (2009), com adaptações, onde 1 g de mel foi homogeneizado em 1 mL de solução de cloreto de sódio 2%. Após, misturou-se a solução durante 1 minuto sob agitação constante. O mel diluído foi extraído cinco vezes com 2 mL acetato de etila (grau HPLC). As fases orgânicas foram combinadas e secas com sulfato de sódio durante 15 minutos, após foram filtradas e seguidas de concentração em evaporador rotativo (40 °C). O resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de metanol/água (3/2, v/v) e uma alíquota foi analisada por LC-MS/MS após microfiltração, através de membranas de 0,45 μm (Millipore, Bedford, MA, EUA), nas amostras *in natura* e após tratamentos térmicos.

A separação cromatográfica e análise espectrométrica das massas foram realizadas conforme descrito por Schulz et al. (2015). Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Alemanha), acoplado a espectrômetro de massas com analisador triploquadropolo e *ion trap* linear, modelo Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá). Os experimentos foram realizados utilizando fonte de ionização por eletrospray TurboIonSpray™ (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canada) em modo negativo. O *software Analyst* versão 1.6.2 foi usado para aquisição e tratamento dos dados obtidos. Os compostos foram separados em coluna Synergi™ (4.0 μm, 2.0 x 150 mm d.i.; Phenomenex, USA). A fase móvel consistiu de uma solução de metanol 95% e água 5% (A) e de água com ácido fórmico 0,1% (B). A separação foi realizada a 30°C utilizando eluição por gradiente segmentado de acordo com as seguintes etapas: 0 – 5 min, 10 % A; 5 – 7 min, 90% A; 7 – 10 min, 90% A; 10 – 17 min, 10% A. O fluxo utilizado foi de 250 μl min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 10 μL. Os compostos foram monitorados utilizando monitoramento de reações múltiplas (MRM). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada com base no tempo de retenção, íon precursor e seus fragmentos através da comparação com os respectivos

padrões disponíveis comercialmente. A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas foi realizada por infusão direta de soluções contendo cada composto de interesse individualmente.

## 2.6 Análises microbiológicas

As amostras de mel foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram realizadas análises de coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e *Salmonella* spp. Porções de 25 g de amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% e as diluições decimais ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) foram semeadas em Solução Salina Peptonada (SSP). A partir destas diluições foram realizadas análises de coliformes termotolerantes e bolores e leveduras.

Para contagem de coliformes termotolerantes a metodologia utilizada foi segundo a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003), com a determinação prévia de coliformes totais após incubação a 35°C/24-48h em Caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST) e posteriormente em Caldo Verde Brilhante Lactose Bile (VBBL) a 35°C/24-48h e finalmente em Caldo para *Escherichia coli* (EC) para contagem de coliformes termotolerantes, incubando em banho-maria com circulação de água a 44,5°C/24-48h, indicando contaminação através de presença de gás pelas colônias.

A contagem de bolores e leveduras seguiu metodologia descrita pela ISO 21527-2:2008, onde das diferentes diluições decimais, semeou-se por incorporação 0,1 mL em meio de cultura DG18 (Dichloran Glicerol), tendo-se efetuado a contagem de colônias após incubação a 25°C durante 5 dias, em aerobiose (ISO 21527-2:2008).

Enquanto que a pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada segundo método 2011.3 (AOAC, 2012), através de um pré-enriquecimento em caldo lactosado a 35°C/24h. Após esta etapa, foi realizado um enriquecimento seletivo em Caldo Tetrionato e Rappaports Vassiliadis, levado a estufa por 42,5°C/24 h. A partir deste, semeou-se uma alíquota em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) a 35°C por 24h. Sendo posteriormente realizado semeadura em ágar Triplíce Açúcar e Ferro (TSI) e Lisina Ferro (LIA) a 35°C/24h.

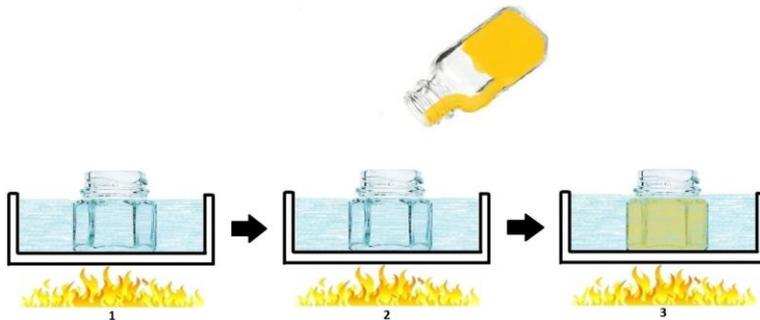
### 2.6.1 Preparo da amostra artificialmente contaminada

Para avaliar a eficiência do tratamento térmico, foi realizada a contaminação artificial de amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Melipona bicolor*) *in natura* com cepas padrão de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803), em Ágar BHI, em fase logarítmica de crescimento, segundo Oliver, Germano e Veiga (2012), com adaptações. Foi feita a suspensão do micro-organismo em 9 mL de solução salina, com turvação correspondente a concentração 0,5 da Escala de Mac Farland, que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup>. Após foram realizadas diluições decimais até  $10^5$  UFC/mL<sup>-1</sup>, sendo selecionadas concentrações bacterianas de forma a obter  $10^5$  UFC. A partir da padronização na escala de MacFarland, 5 mL da solução bacteriana foram adicionados a 35 g de amostra de mel de guaraipeo (*Melipona bicolor*) para posterior tratamento térmico e realização das análises de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp.

### 2.7 Aplicação do tratamento térmico

Para aplicar o tratamento térmico, frascos de vidro sextavado, os quais são comumente utilizados pelos produtores de mel de abelhas sem ferrão, foram submersos em banho termostático de água e aquecidos até que a temperatura atingisse 90, 92,5 e 95°C. Após o banho atingir temperatura ideal para realização do tratamento térmico, o frasco foi preenchido com a amostra de mel de guaraipeo (*Melipona bicolor*) (Figura 3.1). Um termômetro foi inserido no centro da amostra, para controlar a temperatura, sendo esta mantida durante 15, 30 e 60s. Após a amostra atingir o tempo e a temperatura adequados, o frasco foi retirado do banho e restabelecido à temperatura ambiente. As condições experimentais foram determinadas conforme literatura existente (TOSI et al., 2004; KOWALSKI, 2013; BILUCA et al., 2014).

Figura 3.1- Esquemática da aplicação do tratamento térmico em mel de guarapo (*Melipona bicolor*).



1) frasco de vidro sendo aquecido em banho de água; 2) após aquecimento do frasco, ocorre seu preenchimento com mel; 3) tratamento térmico no mel sendo efetivado.

Fonte: próprio autor

## 2.8 Análise Estatística

O *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, E.U.A) foi utilizado para auxiliar o tratamento dos dados obtidos. Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras de mel e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As médias de todos os tratamentos térmico aplicados foram então submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para verificar diferenças entre as médias, sendo que diferenças ao nível de 95% ( $p < 0,05$ ) foram consideradas estatisticamente significantes.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Parâmetros de identidade e qualidade

Os parâmetros de identidade e qualidade (umidade, sólidos solúveis, condutividade elétrica, acidez livre e pH) avaliados no mel após tratamentos térmicos aplicados estão expostos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Características físico-químicas determinadas em mel de guaraiipo (*Melipona bicolor*) *in natura* e após tratamentos térmicos.

Ensaio	Umidade % (m/m)	Sólidos solúveis (°Brix)	Condutividade elétrica (mS cm <sup>-1</sup> )	Acidez livre (mEq kg <sup>-1</sup> )	pH
<i>in natura</i>	30,76 ± 0,73 <sup>b</sup>	68,1 ± 0,69 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	32,93 ± 0,60 <sup>a,b</sup>	3,25 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>1 (90°C/15s)</b>	29,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	69,4 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	30,58 ± 1,35 <sup>a</sup>	3,24 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>2 (90°C/60s)</b>	30,06 ± 0,24 <sup>a,b</sup>	68,8 ± 0,29 <sup>a,b</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	31,45 ± 0,66 <sup>a,b</sup>	3,25 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>3 (95°C/15s)</b>	29,64 ± 0,24 <sup>a</sup>	69,3 ± 0,23 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	32,20 ± 0,40 <sup>a,b</sup>	3,28 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>4 (95°C/60s)</b>	29,50 ± 0,00 <sup>a</sup>	69,4 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	33,88 ± 0,71 <sup>b</sup>	3,28 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>5 (92,5°C/30s)</b>	29,37 ± 0,24 <sup>a</sup>	69,5 ± 0,23 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>a,b</sup>	32,26 ± 0,38 <sup>a,b</sup>	3,49 ± 0,01 <sup>c</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: próprio autor

Para os conteúdos de umidade os resultados obtidos após os tratamentos térmicos aplicados, demonstraram uma redução nos valores. O ensaio 5 (92,5°C/30s) foi o que apresentou a maior redução, de 30,76% (m/m) (*in natura*) para 29,37% (m/m), diferindo estatisticamente da amostra *in natura*, assim como os ensaios 1, 3, 4 e 5. O único tratamento aplicado que manteve o conteúdo de umidade mais próximo da amostra *in natura* foi o ensaio 2 (90°C/60s), apresentando 30,06% (m/m), não diferindo a 5% de significância.

A manutenção das características particulares do mel de abelhas sem ferrão, como a elevada umidade, é essencial para que sua identidade seja garantida a fim de uma nova regulamentação para este mel. Apesar dos conteúdos tão elevados de água fornecerem condição favorável a proliferação das leveduras, a utilização de temperatura elevada e curto tempo podem garantir a inibição e desenvolvimento destes micro-organismos, conforme verificado por Tosi e colaboradores (2004).

Para determinação de sólidos solúveis (°Brix), os dados obtidos após a aplicação dos ensaios mostraram-se maiores que da amostra *in natura*, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Todos os ensaios foram estatisticamente iguais diferindo apenas da amostra *in natura*, no entanto, o ensaio 2 (90°C/60s), assim como para umidade, não diferiu estatisticamente de *in natura*, com 68,8 °Brix. Tais resultados podem ser relacionados com o conteúdo de umidade, uma vez que os ensaios que mais reduziram o teor de umidade foram os mesmos que obtiveram maior conteúdo de sólidos solúveis, e vice-versa. Isto ocorre pelo fato de que quando há perda de água, conseqüentemente há uma maior concentração destes compostos.

Para condutividade elétrica, os dados encontrados na amostra após os tratamentos térmicos, não diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da amostra *in natura*, obtendo valores de 0,25 e 0,26 mS cm<sup>-1</sup>. Pelo fato da condutividade elétrica estar relacionada principalmente com o conteúdo de minerais presentes na amostra, estes compostos não são afetados pelo tratamento térmico, o que pode explicar a manutenção dos valores (CHUA et al., 2014).

A acidez livre encontrada na amostra após tratamentos térmicos mostrou resultados similares à amostra *in natura*, não diferindo a 5% de significância. Apesar de não diferir estatisticamente ( $p < 0,05$ ), a acidez livre nos ensaios variou de 30,58 a 33,88 mEq kg<sup>-1</sup>, enquanto a amostra *in natura* obteve 32,93 mEq kg<sup>-1</sup>. Nota-se que o ensaio 1 o qual utiliza 90°C/15s, apresentou a menor acidez, diferindo do ensaio 4 onde é utilizado maior tempo e temperatura de tratamento (95°/60s),

umentando significativamente a acidez livre. Este aumento pode ser indicativo de fermentação dos açúcares em ácidos orgânicos, onde o 5-HMF em reações sucessivas une-se a duas moléculas de água, produzindo uma molécula de ácido levulínico e outra de ácido fórmico. Destaca-se ainda que mesmo a utilização de temperatura elevada, fator este que pode propiciar a volatilização dos ácidos orgânicos e acarretar em uma diminuição da acidez, os dados obtidos mantiveram-se similares à amostra *in natura* em todos os ensaios realizados, provavelmente em decorrência do curto tempo de tratamento empregado (JURADO-SÁNCHEZ; BALLESTEROS; GALLEGO, 2011). Kowalski (2013) aplicou tratamento térmico com elevada temperatura e longo período de tempo (90°C/60min), em méis de melato, lima, acácia e trigo mourisco (todos de *Apis mellifera*) e verificou, com exceção do mel de acácia, que todos os outros tiveram seus valores de acidez livre reduzidos, apresentando inclusive diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Os valores de pH encontrados mostram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os ensaios 3, 4 e 5 em comparação com a amostra *in natura*. Enquanto o pH obtido para *in natura* é de 3,25, os valores encontrados após tratamentos variaram de 3,24 (ensaio 1) e 3,50 (ensaio 8). Apenas os ensaios 1 (90°C/15s) e 2 (90°C/60s) apresentaram resultados similares a *in natura*, não diferindo estatisticamente. Destaca-se ainda que após os tratamentos térmicos, a característica ácida deste tipo de mel foi mantida. Nascimento e colaboradores (2015), encontraram valor médio de 3,32 em mel de guaraipe *in natura*, dados estes similares a nossa pesquisa.

Para os conteúdos de 5-HMF, após aplicação dos tratamentos térmicos, todos se apresentaram abaixo do LOQ (0,31 mg L<sup>-1</sup>) na curva de calibração, inclusive a amostra *in natura*. Tais resultados obtidos vão de encontro aos obtidos por Biluca e colaboradores (2014), que ao aplicarem tratamento térmico em méis de abelhas sem ferrão e compará-los com *Apis mellifera* antes e após os tratamentos, observaram uma possível resistência deste mel à formação de 5-HMF, uma vez que não houve alteração mesmo o mel sendo submetido a condições extremas de tratamento.

Sabe-se que o conteúdo de 5-HMF é utilizado como indicativo de deterioração, pois é formado pela decomposição de monossacarídeos ou pela *reação de Maillard*, quando o mel é aquecido ou armazenado por um longo período, inclusive apresentando aumento nas suas concentrações à medida que a temperatura e tempo de armazenamento

avançam (CHERNETSOVA; MORLOCK, 2012; TORNUK et al., 2013). Segundo Biluca e colaboradores (2014) a provável resistência deste mel a formação de 5-HMF pode ser atribuída pelos tipos de açúcares que o compõem, onde o conteúdo de frutose predomina e também sua carga de água elevada. Isto porque a velocidade da *reação de Maillard* é mais rápida quando se tem elevado conteúdo de glicose, resultando assim em níveis mais elevados de 5-HMF. Assim como a atividade de água (Aa), pois quando Aa é maior a *reação de Maillard* diminui e conseqüentemente a formação de 5-HMF é reduzida (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007; DAMORAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Para atividade diastásica, análise que também indica envelhecimento e aumento de temperatura do mel, uma vez que as enzimas diastases ( $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases) podem ser reduzidas ao longo do armazenamento ou aquecimento acima de 60 °C, os resultados obtidos mostraram que, tanto a amostra *in natura* quanto após os tratamentos térmicos, a diastase foi < 3 un. Göthe (GOMES et al., 2010; YÜCEL; SULTANOĞLU, 2013).

A Tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos na determinação da quantidade de frutose, glicose e sacarose no mel de guaraipe (*Melipona bicolor*) antes e após tratamentos térmicos aplicados.

Tabela 3.2 - Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose e sacarose encontrados na amostra de mel de guaraiipo (*Melipona bicolor*) *in natura* e após tratamentos térmicos.

Ensaio	Frutose	Glicose	F+G	F/G	G/U	Sacarose
<i>in natura</i>	33,35 ± 0,46 <sup>b</sup>	22,71 ± 0,22 <sup>a</sup>	55,99 ± 0,52 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>a</sup>	< LOQ
<b>1 (90°C/15s)</b>	31,91 ± 0,46 <sup>a,b</sup>	23,25 ± 0,86 <sup>a</sup>	55,16 ± 1,32 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,04 <sup>a,b</sup>	< LOQ
<b>2 (90°C/60s)</b>	31,79 ± 0,18 <sup>a,b</sup>	23,74 ± 0,18 <sup>a</sup>	55,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,03 <sup>a,b</sup>	< LOQ
<b>3 (95°C/15s)</b>	31,96 ± 0,48 <sup>a,b</sup>	23,59 ± 0,60 <sup>a</sup>	55,55 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,02 <sup>a,b</sup>	< LOQ
<b>4 (95°C/60s)</b>	31,46 ± 0,60 <sup>a</sup>	23,83 ± 1,32 <sup>a</sup>	55,29 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,03 <sup>b</sup>	< LOQ
<b>5 (92,5°C/30s)</b>	31,71 ± 0,38 <sup>a</sup>	23,32 ± 0,31 <sup>a</sup>	55,22 ± 0,65 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,02 <sup>a,b</sup>	< LOQ

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). F+G – soma dos conteúdos de frutose e glicose; F/G – razão entre os conteúdos de frutose e glicose; G/U – razão entre glicose e umidade; LOQ – limite de quantificação (0,074 mg L<sup>-1</sup> sacarose) na curva de calibração.

Fonte: próprio autor.

. Para os conteúdos de açúcares encontrados após tratamentos térmicos poucas diferenças estatisticamente significativas puderam ser observadas. Os resultados encontrados para frutose mostraram que apenas os ensaios 1 (90°C/15s), 2 (90°C/60s) e 3 (95°C/15s) não diferiram estatisticamente da amostra *in natura*. Porém, uma redução significativa nos conteúdos pode ser observada, variando de 31,46 (ensaio 4) a 31,96% (m/m) (ensaio 3), enquanto a amostra *in natura* apresentou 33,35% (m/m). Para glicose os resultados obtidos após os tratamentos térmicos não diferiram estatisticamente da amostra *in natura*, a qual apresentou 22,71% (m/m), enquanto que os ensaios mostraram valores entre 23,25 (ensaio 1) e 23,83% (m/m) (ensaio 4). Biluca e colaboradores (2014) também avaliaram conteúdos de açúcares em amostras de méis de abelhas sem ferrão após tratamento térmico e não observaram alterações estatisticamente significativas. Para os conteúdos de sacarose todos os ensaios apresentaram valor abaixo do LOQ (0,074 mg L<sup>-1</sup>) na curva de calibração.

Nas somas dos conteúdos de frutose e glicose, os ensaios aplicados não diferiram estatisticamente da amostra *in natura*. Os valores encontrados nos ensaios variaram de 55,16 (ensaio 1) a 55,55% (m/m) (ensaio 3), enquanto amostra *in natura* apresentou 55,99% (m/m). Apesar da atual regulamentação específica para mel de *Apis mellífera* (BRASIL, 2000) recomendar um conteúdo mínimo de 65% para açúcares redutores, verifica-se em estudos que o mel de abelhas sem ferrão pode conter naturalmente teores mais baixos que este (DE SOUSA et al., 2016; SILVA et al., 2013). Desta forma, é necessário que tal característica, típica deste mel, não seja alterada com o tratamento térmico, mantendo-o mais similar possível da amostra *in natura*.

Com relação a razão F/G, esta serve pra auxiliar na avaliação da tendência a cristalização do mel, devido à menor solubilidade da glicose em água em relação à frutose, assim como a razão G/U. Para F/G, níveis maiores que 1,33 indicam méis fluidos por mais tempo, enquanto que níveis abaixo de 1,11 estes cristalizam rapidamente (ESCUREDO et al., 2014). Apesar dos resultados obtidos mostrarem diferença estatisticamente significativa quando comparado a amostra *in natura*, inclusive apresentando uma redução de F/G, os valores obtidos após os ensaios ficaram entre 1,34 a 1,39, podendo permanecer fluidos por mais tempo. Para G/U, quanto menor for a razão mais lentamente ocorrerá a cristalização do mel, desta forma, Dobre e colaboradores (2012) relata que ela é lenta ou nula quando a G/U é inferior a 1,7 e completa e rápida quando a relação é superior a 2. Diferenças estatisticamente

significativas não foram observadas neste parâmetro, exceto para o ensaio 4, o qual apresentou G/U de 0,81, diferindo da amostra *in natura*. No entanto, os valores obtidos nos ensaios variaram entre 0,77 a 0,81, o que pode representar uma lenta cristalização deste mel.

### 3.2 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

Os resultados obtidos para compostos fenólicos totais e para atividade antioxidante e redutora (DPPH e FRAP) em mel de guaraiipo (*Melipona bicolor*) *in natura* e após tratamento térmico são mostrados na Tabela 3.4.

Para o conteúdo de compostos fenólicos totais os resultados encontrados diferiram estatisticamente da amostra *in natura*, a qual apresentou 20,26 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>, enquanto os ensaios mostraram um aumento nos conteúdos, obtendo valores entre 24,76 (ensaio 2) e 26,81 (ensaio 4) mg EAG 100 g<sup>-1</sup> (Tabela 3.3). Alguns autores têm relatado, em estudos com mel de *Apis mellífera*, que após a aplicação de tratamento térmico tal incremento dos conteúdos de compostos fenólicos totais é observado.

Recentemente, Chaikham e Prangthip (2015) avaliaram os efeitos da alta pressão hidrostática, de ultrassom e tratamento térmico sobre as propriedades antioxidantes de méis da flor de lótus. Os autores relatam que as amostras submetidas a 50°C e 70°C por 5 min apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais quando comparadas as amostras sem tratamento, no entanto aquelas submetidas a 100°C mostraram uma redução nos conteúdos com o passar do tempo (1, 3 e 5 min). Kowalski (2013) também verificou aumento dos teores de compostos fenólicos totais em méis de acácia e lima, após passarem por tratamento térmico com elevada temperatura (90°C/60min). Assim como Akhmazillaha, Farid e Silva (2013) também observaram este aumento em amostras de mel de manuka (flor nativa da Nova Zelândia) após processamento térmico de 50°C, 60°C e 70°C por 5, 10, 15 e 30 min. Segundo Chaikham e Prangthip (2015) tal fato se deve possivelmente a dissociação destes compostos durante o processamento térmico.

Tabela 3.3 - Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante de mel de guaraipeo (*Melipona bicolor*) *in natura* e após tratamentos térmicos.

Ensaio	Fenólicos totais (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )	DPPH (mg EAA 100 g <sup>-1</sup> )	FRAP (μmol Fe II 100 g <sup>-1</sup> )
<i>in natura</i>	20,26 ± 0,24 <sup>a</sup>	6,66 ± 0,83 <sup>b</sup>	114,50 ± 2,13 <sup>a</sup>
<b>1 (90°C/15s)</b>	25,55 ± 0,71 <sup>b,c</sup>	4,64 ± 1,53 <sup>a,b</sup>	143,21 ± 1,51 <sup>b</sup>
<b>2 (90°C/60s)</b>	24,76 ± 0,59 <sup>b,c</sup>	3,27 ± 0,30 <sup>a</sup>	139,83 ± 1,51 <sup>b</sup>
<b>3 (95°C/15s)</b>	25,09 ± 0,36 <sup>b,c</sup>	4,22 ± 0,39 <sup>a,b</sup>	154,37 ± 0,75 <sup>c</sup>
<b>4 (95°C/60s)</b>	26,81 ± 0,98 <sup>c</sup>	3,94 ± 0,58 <sup>a</sup>	145,56 ± 0,38 <sup>b</sup>
<b>5 (92,5°C/30s)</b>	25,58 ± 0,60 <sup>b,c</sup>	3,59 ± 0,72 <sup>a</sup>	138,10 ± 0,38 <sup>b</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05). EAG – equivalentes a ácido gálico; EAA – equivalentes a ácido ascórbico.

Fonte: próprio autor

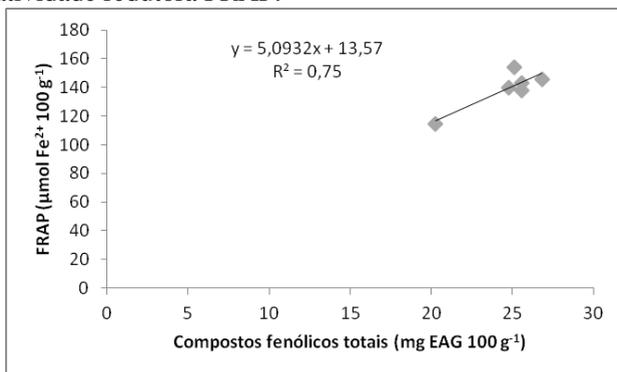
Na determinação da atividade antioxidante e redutora diferenças estatisticamente significativas foram observadas após a aplicação dos tratamentos térmicos (Tabela 3.3). Para atividade antioxidante DPPH, os resultados mostraram uma redução quando comparado a amostra *in natura*, diferindo estatisticamente. A amostra *in natura* apresentou 6,66 mg EAA 100 g<sup>-1</sup>, enquanto os resultados dos ensaios variaram de 3,27 (ensaio 2) a 4,64 (ensaio 1) mg EAA 100 g<sup>-1</sup>. No entanto, mesmo sendo verificadas reduções nos teores, os ensaios que utilizaram um tempo mais rápido de processamento, independente da temperatura utilizada, não diferiram estatisticamente da amostra *in natura*, sendo os ensaios 1 (90°C/15s) e 3 (95°C/15s) os que apresentaram valores similares a amostra *in natura*.

Similar aos resultados obtidos neste estudo, Chaikham e Prangthip (2015) observaram que quando amostras de mel da flor de lótus foram submetidas a 100°C, estas tiveram um decréscimo nos conteúdos de DPPH a medida que o tempo de processamento avançava (1, 3 e 5 min). Segundo os autores a diminuição destes conteúdos podem ser ocasionados principalmente devido a degradação por processo de aquecimento elevado por um tempo prolongado. Porém, Kowalski (2013) observou um aumento na atividade antioxidante DPPH quando aplicado 90°C/30 min em méis de melato, lima, acácia e trigo mourisco, assim como Fauzi, Farid e Silva (2013) relataram aumento da atividade antioxidante DPPH em méis de manuka após processamento térmico de 50°C, 60°C e 70°C por 10 min. Segundo Turkmen e colaboradores (2006) este comportamento pode ser consequência da formação de compostos com atividade antioxidante diferente em várias fases das reações de *Maillard*, dependendo das temperaturas de tratamento e composição do produto.

Para análise de FRAP a amostra *in natura* diferiu estatisticamente daquelas submetidas ao tratamento térmico, as quais apresentaram conteúdos mais elevados. Enquanto a amostra *in natura* apontou valor de 114,5 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup>, aquelas submetidas aos ensaios variaram de 139,83 (ensaio 2) a 154,37 (ensaio 3) µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup>. Para Chaikham e Prangthip (2015) este fenômeno pode ter ocorrido devido à dissociação de certos compostos através do processamento térmico. Estes mesmos autores também observaram aumento de FRAP quando aplicado 50°C por 1, 3 e 5 min e 70°C por 1 e 3 min em méis da flor de lótus. No entanto quando aplicado 100°C os teores reduziram a medida que o tempo avançou (1, 3 e 5 min) para estas mesmas amostras.

É possível perceber com os dados obtidos, que existe uma correlação positiva linear forte e significativa ( $p < 0,05$ ) entre o teor de compostos fenólicos totais e atividade redutora (FRAP), com valor de  $r^2$  igual a 0,75 (Figura 3.2). Para compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH) não foi observada correlação. Tal fato pode ser explicado devido aos diferentes mecanismos de ação destas análises, onde a determinação de compostos fenólicos totais, através do ensaio de Folin-Ciocalteu, se dá por um mecanismo de reação de oxidação-redução (SINGLETON et al., 1965). O FRAP avalia a capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo  $\text{Fe}^{3+}$  (2,4,6-Tripiridil-s-triazina-TPTZ) a  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso-tripiri-diltriazina) em pH ácido (NIKI, 2010). Ou seja, os mecanismos são similares, pois avaliam o poder de redução de determinados complexos. Enquanto que o método de sequestro de radicais livres (DPPH) está baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (NIKI, 2010).

Figura 3.2 - Correlação obtida entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade redutora FRAP.



### 3.3 Identificação de compostos fenólicos

Para avaliar a presença dos compostos fenólicos em mel de guaraipe (*Melipona bicolor*) *in natura* e após tratamentos térmicos, foram selecionados 45 compostos que são comumente encontrados em amostras de mel. A Tabela 3.5 apresenta os parâmetros do espectrômetro de massas obtidos pela infusão dos padrões de compostos fenólicos.

Tabela 3.4 - Parâmetros do espectrômetro de massas obtidos pela infusão dos padrões de compostos fenólicos.

<b>Compostos</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CEP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
4-aminobenzoico	-20,00	-9,50	-10,00	-16,00	-2,00
Ácido salicílico	-25,00	-2,50	-10,00	-24,00	-2,00
Ácido cinâmico	-25,00	-9,00	-10,00	-16,00	-2,00
Ácido p-anísico	-25,00	-5,00	-10,00	-18,00	-2,00
Ácido mandélico	-20,00	-7,50	-10,00	-12,00	-2,00
Vanilina	-25,00	-3,00	-14,00	-14,00	-2,00
Ácido 4-hidroximetilbenzoico	-30,00	-6,50	-10,00	-18,00	-2,00
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	-30,00	-7,00	-10,00	-20,00	-2,00
Umbeliferona	-55,00	-4,50	-10,00	-22,00	-4,00
Ácido p-cumárico	-21,00	-4,00	-17,69	-13,00	-6,00
Ácido metoxifenilacético	-10,00	-10,00	-10,00	-6,00	-2,00
Ácido vanílico	-30,00	-7,00	-10,00	-18,00	-2,00
Ácido gálico	-25,00	-11,00	-12,00	-20,00	-4,00
4-metilumbeliferona	-45,00	-10,50	-10,00	-28,00	-2,00
Coniferaldeído	-25,00	-10,00	-12,00	-20,00	-2,00
Ácido cafeico	-30,00	-11,00	-10,00	-22,00	-2,00
Siringaldeído	-25,00	-4,50	-10,00	-20,00	-4,00
Escopoletina	-35,00	-4,00	-12,00	-14,00	-2,00
Ácido ferúlico	-40,00	-7,00	-10,00	-24,00	-2,00
Ácido siríngico	-30,00	-10,50	-12,00	-28,00	-2,00
Sinapaldeído	-30,00	-3,00	-12,00	-22,00	-2,00
Ácido sinápico	-30,00	-12,00	-16,00	-22,00	0,00
Resveratrol	-50,00	-8,50	-18,00	-24,00	-4,00
Crisina	-65,00	-10,00	-20,00	-52,00	-2,00
Pinoembrina	-60,00	-12,00	-22,00	-54,00	-2,00
Apigenina	-75,00	-9,00	-14,00	-46,00	-2,00
Galangina	-75,00	-8,50	-16,00	-64,00	-10,00
Naringenina	-60,00	-4,50	-12,00	-28,00	-2,00
Campferol	-75,00	-4,50	-16,00	-62,00	-2,00
Eriodictiol	-75,00	-9,50	-16,00	-36,00	-4,00
Aromadendrina	-45,00	-4,00	-16,00	-32,00	-2,00
Fustina	-45,00	-4,00	-14,00	-38,00	-2,00
Catequina	-55,00	-4,50	-14,00	-34,00	-4,00
Epicatequina	-290,00	-4,00	-16,00	-40,00	-2,00
Hispidulina	-50,00	-7,00	-22,00	-14,00	-4,00
Ácido elágico	-50,00	-10,50	-16,00	-58,00	0,00
Quercetina	-80,00	-6,00	-14,00	-32,00	0,00
Taxifolina	-95,00	-10,50	-16,00	-30,00	-2,00

(continua)

(continuação)

Miricetina	-65,00	-4,50	-18,00	-34,00	-2,00
Carnosol	-75,00	-5,00	-16,00	-16,00	-4,00
Ácido clorogênico	-25,00	-5,00	-24,00	-28,00	-2,00
Ácido rosmarínico	-50,00	-3,00	-18,00	-28,00	-4,00
Isoquercetina	-245,00	-3,00	-48,00	-44,00	-2,00
Naringina	-250,00	-4,00	-36,00	-52,00	-2,00
Rutina	-31,00	-5,00	-34,19	-27,00	-6,00

DP - Potencial de desagregação; EP – Potencial de entrada; CEP – Potencial de entrada da célula de colisão; CE – Energia de colisão; CXP - Potencial de saída da célula de colisão.

Fonte: próprio autor.

A partir das informações obtidas nos espectros de massas e dos tempos de retenção dos padrões listados na Tabela 3.4 e das amostras, foi possível identificar 11 compostos fenólicos presentes na amostra de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*) *in natura* e após tratamentos térmicos. Destes, 5 compostos pertencem a classe dos ácidos fenólicos (salicílico, 3,4-dihidroxibenzoico,  $\rho$ -cumárico, vanílico e clorogênico), 5 compostos aos flavonoides (apigenina, naringenina, aromadendrina, hispidulina e taxifolina) e 1 a cumarina (escopoletina) (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Compostos fenólicos identificados nas amostras de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*) *in natura* e após tratamentos térmicos.

Composto	Íon precursor (m/z) Q1	Íon quantitativo (m/z) Q3	Tempo de retenção (min)	LOD (mg L <sup>-1</sup> )
Ácido salicílico	136,9	90,5	10,47	0,004
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	152,83	106,0	6,92	0,012
Ácido $\rho$ -cumárico	163,040	119,0	10,46	0,001
Ácido vanílico	166,831	148,50	9,65	0,008
Escopoletina	190,727	172,80	10,99	0,001
Apigenina	268,794	114,80	12,62	0,003
Naringenina	270,847	150,20	12,37	0,001
Aromadendrina	286,824	123,90	11,29	0,001
Hispidulina	298,825	282,70	12,72	0,001
Taxifolina	302,815	120,70	10,70	0,003
Ácido clorogênico	352,863	187,80	9,19	0,003

Fonte: próprio autor

Em mel de abelhas sem ferrão, este é o primeiro relato na literatura, até o momento, dos compostos salicílico, escopoletina, aromadendrina e hispidulina. Vit, Soler e Tomas-Barberán (1997), Vit e Tomas-Barberán (1998) e Silva e colaboradores (2013) avaliaram perfil

de flavonoides e ácidos fenólicos em méis de abelhas sem ferrão da Venezuela e do Brasil, respectivamente, e também identificaram 3,4-dihidroxibenzoico, vanílico, apigenina e naringenina. Já outros compostos que foram identificados neste estudo, tais como taxifolina,  $\rho$ -cumárico e clorogênico, no estudo realizado por Silva e colaboradores (2013), o qual analisou estes e outros compostos fenólicos em mel de jandaíra, os autores não observaram a presença destes mesmos compostos nas amostras. Dos estudos realizados até o momento, percebe-se também que os flavonoides caempferol, quercetina, miricetina e os ácidos fenólicos elágico e gálico, foram identificados em algumas amostras de mel de abelhas sem ferrão, no entanto não foram identificados neste estudo (VIT; SOLER; TOMAS-BARBERÁN, 1997; VIT; TOMAS-BARBERÁN, 1998; SILVA et al., 2013).

Segundo Can e colaboradores (2015) a verdadeira qualidade do mel está associada com a presença, variedade e quantidade de compostos bioativos e isto depende da localização geográfica e região floral em que o mel foi produzido. Desta forma, a identificação de flavonoides e ácidos fenólicos pode ser útil na determinação da origem botânica de alguns tipos de méis (SERGIEL; POHL; BIESAGA, 2014). Vit e Tomas-Barbean (1998) verificaram em seus estudos com méis de abelhas sem ferrão que amostras da mesma região geográfica tinham perfis de flavonoides semelhantes. Já Silva e colaboradores (2013) verificou que naringenina estava presente em todas as amostras de mel de abelhas sem ferrão da mesma origem floral.

Quanto aos tratamentos térmicos aplicados nas amostras, foi possível perceber que estes não modificaram o perfil de compostos fenólicos encontrado anteriormente nas amostras *in natura*. O fato do perfil destes compostos ser mantido após os tratamentos térmicos é particularmente relevante, uma vez que a presença de alguns compostos antioxidantes naturais específicos nestes méis (eficazes na proteção da saúde humana e redução do risco de doenças) pode dar-lhes um importante valor agregado. Escriche e colaboradores (2014) ao avaliar o impacto do tratamento térmico industrial em méis espanhóis de *Apis mellifera*, sobre os flavonoides e ácidos fenólicos, observaram uma diminuição significativa apenas para os compostos galangina, caempferol, miricetina e  $\rho$ -cumárico.

### 3.4 Análise microbiológica

Na busca pela verificação da eficiência do tratamento térmico na redução de micro-organismos que poderiam afetar a qualidade e segurança do mel de abelhas sem ferrão, foram realizadas análises de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. na amostra *in natura* e após tratamento térmico.

Na amostra de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*) *in natura* os resultados obtidos foram: bolores e leveduras < 10 UFC/g, coliformes termotolerantes < 0,3 NMP/g e ausência em 25g de *Salmonella* spp, demonstrando não haver contaminação.

Desta forma, foi necessária a realização da contaminação artificial na amostra *in natura*, pelas cepas *Candida* spp., *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., para que a amostra tivesse uma carga microbiana inicial elevada, a fim de verificar se o tratamento térmico é capaz de reduzir estes micro-organismos.

Após o procedimento de contaminação artificial da amostra *in natura*, escolheu-se o tratamento térmico de 90°C/60s para aplicação, por ter sido este o tratamento que apresentou, em todos os parâmetros de identidade e qualidade, resultados similares à amostra *in natura*, ou seja, que manteve suas características químicas inalteradas.

A Tabela 3.6 apresenta as cargas microbianas de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp., obtidas na amostra *in natura contaminada* e após esta ser submetida ao tratamento térmico de 90°C/60s.

Tabela 3.6 - Cargas microbianas de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. na amostra de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*) *in natura* contaminada e após tratamento térmico (90°C/60s).

	<b>Bolores e leveduras (UFC/g<sup>-1</sup>)*</b>	<b>Coliformes termotolerantes (NMP/g<sup>-1</sup>)*</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. (25 g)*</b>
INC	2,1x10 <sup>2</sup>	110	Presença
90°C/60s	< 10	< 3	Ausência

\*n = 5. INC: amostra *in natura contaminada*. UFC: unidades formadoras de colônia. NMP: número mais provável.

Fonte: próprio autor

Os resultados de bolores e leveduras mostraram que inicialmente a amostra de mel de abelhas sem ferrão (*Melipona bicolor*) *in natura*,

contaminada artificialmente pela cepa *Candida* spp. apresentou  $2,1 \times 10^2$  UFC/g<sup>-1</sup>. A contagem de bolores e leveduras pode ser útil na definição da vida útil do produto e identificação do potencial de degradação, isto porque o consumo de açúcares pelas leveduras resulta na produção de subprodutos que alteram o paladar e aroma final, ou seja, causam a indesejável fermentação do mel (MENDES et al., 2009).

Após o tratamento térmico, o resultado de bolores e leveduras obtido foi de  $< 10$  UFC/g<sup>-1</sup>. Isto demonstra que o tratamento térmico foi eficaz na redução destes micro-organismos, sob as condições realizadas neste estudo. A redução de bolores e leveduras no mel, principalmente de leveduras é extremamente relevante, uma vez que o seu desenvolvimento em mel de abelhas sem ferrão é mais propenso devido a elevada Aa e baixo pH (condições ideais para desenvolvimento de leveduras) do produto (SNOWDON; CLIVER, 1996). Tosi e colaboradores (2004) avaliaram o impacto do tratamento térmico na inibição de bolores e leveduras em mel de *Apis mellifera*. O estudo mostrou que um tratamento térmico de 80°C/60s foi capaz de inibir completamente todos os bolores e leveduras presentes nos méis analisados.

Para coliformes termotolerantes, os resultados obtidos na amostra *in natura*, contaminada artificialmente com *Escherichia coli*, apresentou contagem de 110 NMP/g<sup>-1</sup>. Após o tratamento térmico (90°C/60s) a contagem de coliformes termotolerantes reduziu para  $< 3$  NMP/g<sup>-1</sup>, sugerindo a eficácia deste processamento na redução destes micro-organismos. As contagens de coliformes em alimentos podem indicar a falta de práticas sanitárias de higiene, onde condições inadequadas durante o processamento, produção e armazenamento podem estar ocorrendo (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Por isso, a redução destes micro-organismos, através do tratamento térmico, poderá garantir a segurança alimentar do produto.

Na avaliação de *Salmonella* spp. o resultado inicial, após contaminação artificial da amostra *in natura* com cepa de *Salmonella* spp., revelou a presença em 25 g de amostra. O tratamento térmico (90°C/60s) pode ser considerado efetivo ao resultar em ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra tratada termicamente. Na literatura não há relatos de desenvolvimento deste micro-organismo no mel, porém em trabalho realizado por Oliveira, Ribeiro e Oliveira (2013) com méis de abelhas sem ferrão, uma das amostras analisadas apresentou presença de *Salmonella* spp., o que pode estar associado ao hábito forrageiro desta espécie ou a presença de inquilinos

contaminados na colmeia (Nogueira-Neto 1997). Desta forma, a verificação da eficácia do tratamento em eliminar o micro-organismo se faz importante, uma vez que a *Salmonella* spp. é uma bactéria patógena, causadora de toxinfecção alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

#### 4 CONCLUSÃO

Após aplicação de tratamentos térmicos com temperatura elevada e curto tempo de processamento nas amostras de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*) foi possível observar que a utilização de 90°C por 60 segundos destacou-se apresentando resultados semelhantes a amostra *in natura*, para todos os parâmetros de identidade e qualidade analisados. Além do mais, nenhum tratamento alterou os conteúdos de 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) nas amostras. Quanto aos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante e redutora (DPPH e FRAP), observou-se correlação entre fenólicos totais e FRAP, com aumento dos seus conteúdos após tratamentos térmicos, enquanto que DPPH reduziu seus valores. Também verificou-se que após os tratamentos, os mesmos compostos fenólicos identificados na amostra *in natura* foram observados. O tratamento 90°C/60s foi capaz de reduzir as cargas microbianas de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp, garantindo a qualidade e segurança alimentar. Desta forma, é possível sugerir que o tratamento térmico com elevada temperatura e curto tempo de processamento, possa prorrogar ser utilizado, visando o aumento de vida de prateleira, sem que suas características sejam alteradas, e principalmente sua qualidade e segurança, em virtude da possível resistência a formação de 5-HMF e redução da carga microbiana indesejável no produto.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na caracterização de dez diferentes amostras de mel de abelhas sem ferrão *in natura* foi evidenciado diferença existente quanto aos parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação vigente para méis de abelha *Apis mellifera*, destacando-se a necessidade de padronização e implantação de uma nova regulamentação específica para este produto.

Com a aplicação dos tratamentos térmicos foi possível perceber que aqueles recomendados pela legislação do mel de *Apis mellifera* podem ser aplicados em méis de abelhas sem ferrão, pois contribuíram na manutenção das características físico-químicas deste tipo de mel. No entanto, a utilização de temperatura elevada com menor tempo de processo poderia ser mais adequado, levando em consideração a viabilidade, condições operacionais e custos.

Após aplicação de tratamentos térmicos com temperatura elevada e curto tempo de processamento, em amostras de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*), o ensaio 2, que utilizou 90°C por 60s destacou-se por reportar valores bem similares a amostra *in natura* em todos os parâmetros de identidade e qualidade analisados.

Outro ponto relevante que merece destaque foi o fato de que os tratamentos térmicos aplicados (tantos os sugeridos pela legislação de *Apis mellifera*, quanto os definidos por delineamento experimental) não alteraram os conteúdos de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), confirmando a possível resistência a formação de 5-HMF deste tipo de mel.

Foi possível verificar correlação entre os compostos fenólicos totais e atividade redutora (FRAP) após as amostras serem submetidas tanto aos tratamentos térmicos sugeridos pela legislação quanto aqueles com temperatura elevada e curto tempo de processamento. Pode-se observar também redução nos valores de DPPH após tratamentos.

Além do mais, os tratamentos térmicos com temperatura elevada e curto tempo de processamento mantiveram os mesmos compostos fenólicos identificados na amostra *in natura* de mel de guaraipe (*Melipona bicolor*) naquelas tratada termicamente. Assim como, o tratamento 90°C/60s foi capaz de reduzir as cargas microbianas de bolores e leveduras, coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp, garantindo a qualidade e segurança alimentar.

Desta forma, é possível sugerir que o tratamento térmico com elevada temperatura e curto tempo de processamento, possa prorrogar a

vida de prateleira, sem que suas características sejam alteradas e principalmente sua qualidade e segurança.

Os resultados obtidos neste trabalho servem como base de dados para auxiliar no desenvolvimento de um processamento adequado que prolongue a vida de prateleira do produto. O que contribui para a determinação da vida de prateleira do produto, quebrando o entrave existente no momento, onde mesmo havendo crescente demanda pelo produto, a sua distribuição no mercado ainda é limitada, devido a falta de padrões de garantia de qualidade, bem como a reduzida vida de prateleira.

Como perspectivas de trabalhos verifica-se a necessidade do monitoramento da estabilidade química destes méis durante o armazenamento prolongado, uma vez que o mel apresenta características físico-químicas distintas, capazes de acelerar processos degradativos, reduzindo o seu tempo de vida útil. Além do tratamento térmico para estender a vida de prateleira do produto, uma vez que estudos que comprovem sua eficácia no mel de abelhas sem ferrão ainda não foram realizados até o momento.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMOVIČ, H. et al. Water activity and water content in Slovenian honeys. **Food Control**, v. 19, n. 11, p. 1086–1090, 2008.
- ACRIAPA, Associação de Criadores de Abelhas Nativas da APA de Guaraqueçaba. **Uruçu amarela (*Melipona mondury*)**, 2011. Disponível em: < <https://acriapa2007.wordpress.com/2011/03/11/urucu-amarela-melipona-mondury/>>. Acesso em 21 jun. 2015.
- AGUILAR-MONGE, I. El potencial de las abejas nativas sin aguijón (Apidae, Meliponinae) en los sistemas agroforestales, 1999. Disponível em<<http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/afri/esp/document/agrof99/aguilari.htm>>. Acesso em 10 jun. 2015.
- AHMED, M. et al. In vitro activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 10, p. 816-821, 2013.
- AIDAR, D. S. **A mandaçaia: biologia, manejo e multiplicação artificial de colônias de abelhas, com especial referência à *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 2 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2010. 161p.
- AKHMAZILLAH, M. F. N.; FARID, M. M.; SILVA, F. V. M. High pressure processing (HPP) of honey for the improvement of nutritional value. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, p. 59-63, 2013.
- AL, M. L. et al. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**. v. 112, p. 863–867, 2009.
- ALMEIDA-ANACLETO, D. et al. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* latreille, 1811). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 535-541, 2009.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 8, p. 1698-1706, 2013.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. *Tetragonisca angustula* pot-honey compared to *Apis mellifera* honey from Brazil. In: VIT; PEDRO; ROUBIK (Eds.). **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. p. 375-382.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; STRAMM, K. M.; ESTEVINHO, L. M. Efficiency of the FT-IR ATR spectrometry for the prediction of the physicochemical characteristics of *Melipona subnitida* honey and study of the temperature's effect on those properties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 1, p. 188-195, 2014.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 1508 – 1516, 2012.

ALVES, A. et al. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 30, p. 130–138, 2013.

ALVES, R. M. O. et al. Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. **Mensagem Doce**, v. 91, p. 2-8, 2007.

ANANIAS, K. R.; MELO, A. A. M.; MOURA, C. J. Analysis of moisture content, acidity and contamination by yeast and molds in *Apis mellifera* L. honey from central Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 679-683, 2013.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. In: W. HORWITZ (Ed) (18.ed.). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, Inc., 2005.

ARAÚJO, J. Química de alimentos: teoria e prática. 5 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 601p.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA, 2012. 326p.

BAGHIANI, A. et al. Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of *Ajuga iva* L. Extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 21–30, 2011.

BASUALDO, C. et al. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 375-381, 2007.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of —Antioxidant Power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.

BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. **Food Chemistry**. v. 136, p. 46–54, 2013.

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

BILUCA, F. C. **Caracterização química e influencia do tratamento térmico em méis de abelha sem ferrão (*meliponinae spp.*) produzidos no estado de Santa Catarina**. 2014. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BILUCA, F. C. et al. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 244-249, 2014.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **Journal List World Allergy Organ**, v. 5, n. 1. p. 9 – 19, 2012.

BOGDANOV, S. Honey quality and international regulatory standards: Review by the International Honey Commission. **Bee World**. v. 90, p. 61-69, 1999.

BRAND-WILLIAMNS, W.; CUVERLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. MAPA, Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 6, de 25 de julho de 1985. **Normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para o mel, cera de abelhas e derivados**. MAPA, Brasília, 1985.

BRASIL. Ministério do Meio-Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 346 de 16 de agosto de 2004. **Utilização de abelhas silvestres e implementação de meliponários**. Diário Oficial da União, Brasília, 17 de agosto de 2004.

CAIXA para abelha guaraipe – faça você mesmo, 2013. Disponível em: < <http://www.abelhasemferrao.com/caixa-para-abelha-guaraipe-faca-voce-mesmo/>>. Acesso em 21 jun. 2015.

CAN, Z. et al. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, v. p. 133–141, 2015.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **Food Science and Technology**. v. 44, p. 793-810, 2011.

CARVALHO, C. A. L, et al. Proposta de regulamento técnico de qualidade físico-química do mel floral processado produzido por abelhas do gênero *Melipona*. In: VIT P.; ROUBIK D.W. (Ed.). *Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots*. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela. 2013. 1-9p.

CARVALHO, C. A. L. et al. **Mel de abelhas sem ferrão**: contribuição para a caracterização físico-química. Universidade Federal da Bahia. Cruz das Almas/SEAGRI-BA, 2005. 32 p. (Série meliponicultura n. 04).

CARVALHO-ZILSE, G. A. et al. **Meliponicultura na Amazônia**. Manaus: [s.n.], 2012. 50p.

CHAIKHAM, P.; PRANGTHIP, P. Alteration of antioxidative properties of longan flower-honey after high pressure, ultra-sonic and thermal processing. **Food Bioscience**, v. 10, p. 1-7, 2015.

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

CHIȘ, A.; PURCĂREA, C. Quality of chestnut honey modified by thermal treatment. **Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, Seria Științele Vietii**, v. 21, n. 3, p. 573-579, 2011.

CHUA, L. S. et al. Effect of thermal treatment on the biochemical composition of tropical honey samples. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 773-778, 2014.

CHUTTONG, B. et al. Physicochemical Profiles of Stingless Bee (*Apidae: Meliponini*) Honey from South East Asia (Thailand), **Food Chemistry**, v. 192, p. 149-155, 2016.

CODEx STAN 12. Codex Alimentarius Comission. Codex Standard for Honey, n. 12, v. 11, rev. 2, p. 1-8, 2001.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 453p.

CORTOPASSI-LAURINO, M. et al. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 275-292, 2006.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1987. 226p.

DA SILVA, P. M. et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309-323, 2016.

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

DARDÓN, M. J.; MALDONADO-AGUILERA, C.; ENRÍQUEZ, E. The pot-honey of Guatemala bees. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. p. 395–408.

DE SOUSA, J. M. B. et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 645-651, 2016.

DEAN, J. R. **Method for environmental trace analysis: analytical techniques in the sciences**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.

DEL RIO, D. et al. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.

DOBRE, I. et al. Rheological behavior of different honey types from Romania. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 126-132, 2012.

ERB, M. et al. The Role of Plant Primary and Secondary Metabolites in Root-Herbivore Behaviour, Nutrition and Physiology. In: JOHNSON, S. N.; HILTPOLD, I.; TURLINGS, T. C. J. (Ed.) **Behaviour and Physiology of Root Herbivores**. New York: Elsevier, 2013. p. 53-95.

ESCRICHE, I. et al. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 329-338, 2009.

ESCRICHE, I. et al. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food chemistry**, v. 142, p. 135-143, 2014.

ESCRICHE, I. et al. Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. **Food Research International**. v. 44, p. 1504–1513, 2011.

ESCUREDO, O et al. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v. 149, p. 84–90. 2014.

ESCUREDO, O. et al. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**. v. 138, p. 851–856, 2013.

FALLICO, B. et al. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 305-313, 2004.

FAUZI, N. A.; FARID, M. M.; SILVA, F. V. M. High-pressure processing of Manuka honey: improvement of antioxidant activity, preservation of colour and flow behaviour. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 8, p. 2299-2307, 2014.

FEÁS, X. et al. Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3462-3470, 2010.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

FERRUFINO, U.; VIT, P. Pot-honey of six Meliponines from Amboro National Park, Bolivia. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. p. 409–416.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M.; Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 4, p. 1649-1653, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. 196p

FRIGIERI, F. F. **Como criar abelha jataí em casa**, 2011. Disponível em: < <https://plantandovida.wordpress.com/2011/04/28/criacao-de-abelha-jatai-em-casa/>>. Acesso em 25 jun. 2015.

FUENMAJOR, C. A. et al. Honey of Colombian Stingless Bees: Nutritional Characteristics and Physicochemical Quality Indicators. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. p. 383–394.

GAMBACORTA, E. et al. Antioxidant properties and phenolic content of sulla (*Hedysarum* spp.) honeys from Southern Italy. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 10, p. 2260-2268, 2014.

GHELDOLF, N.; WANG, X.; ENGESETH, N. J. Identification and quantification of antioxidants components of honeys from various floral sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 5870-5877, 2002.

GOMES, S. et al. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 544–548, 2010.

GÖRLACH, A. et al. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved?. **Redox Biology**, v. 6, p. 372-385, 2015.

GRANATO, D.; ALEZANDRO, M. R.; NAZZARO, F. Food bioactive compounds: Quality control and functional properties. **Food Research International**, v. 77, p. 73-74, 2015.

GUERRINI, A. et al. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p.1413-1420, 2009.

HABIB, H. M. et al. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, p. 28–34, 2014.

HARVEY, D. **Modern analytical chemistry**. New York: McGraw Hill, 2000.

HOLANDA, C. A. et al. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* Smith da região do cerrado maranhense. **Química Nova**, v. 15, p. 1-4, 2012.

ISLAM, M. D. et al. Toxic compounds in honey. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 7, p. 733-742, 2014.

ISO 21527:2:2008 – “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95”, International Standards Organization, Switzerland.

JAFFÉ, R. et al. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. **PloS One**, v. 10, n. 3, 2015.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711p.

JELLEN, H. **Food flavors: Chemical, sensory and technological properties**. New York: CRC Press, 2011. 492p.

JURADO-SÁNCHEZ, B.; BALLESTEROS, E.; GALLEGO, M. Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction. **Talanta**, v. 84, p. 924–930, 2011.

KAMAL, M. A.; KLEIN, P. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 17-21, 2011.

KAPLAN, M.; OLGUN, E. O.; KARAOGLU, O. Determination of grayanotoxins in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry using dilute-and-shoot sample preparation approach.

**Journal of agricultural and food chemistry**, v. 24, p. 5485- 5491, 2014.

KARABAGIAS, I. K. et al. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. **Food Chemistry**. v. 146, p. 548–557, 2014.

KEHRER, J. P.; ROBERTSON, J. D.; SMITH, C. V. Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In: MCQUEEN, C. A. (Ed.). **Comprehensive Toxicology**, Amsterdam: Elsevier, 2010. p. 277 - 307.

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

KIRS, E. et al. Physicochemical and melissopalynological characterization of Estonian summer honeys. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 616-624, 2011.

KLEINERT, A. M. P. et al. **Abelhas sociais (Bombini, Apini, Meliponini)**. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P (Ed.). Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009. 371-424p.

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

LACHMAN, J. et al. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 52-58, 2010.

LACINA, O. et al. Identification/quantification of multiple pesticide residues in food plants by ultra-high-performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 5, p. 648-659, 2010.

LANDERS, J. P. **Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. 3. ed. Boca Raton: Ed. CRC Press, 2008.

LAZAREVIC, K. B. et al. Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2060–2064, 2012.

LIANG, P. et al. Determination of carbohydrates in honey and milk by capillary electrophoresis in combination with graphene–cobalt microsphere hybrid paste electrodes. **Food Chemistry**, v. 190, p. 64–70, 2016.

LIBERATO, M. C. T. C. et al. Estudo Comparativo do Teor de Fenóis totais, Flavonoides e Atividade Antioxidante de méis de *Melipona subnitida* D. e *Apis mellifera* L. oriundos da localidade de Açú no Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 53., 2013, Rio de Janeiro. **Anais CBQ**: Rio de Janeiro, 2013.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.

MANZOCCO, L. et al. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends in food science & technology**, v. 11, n. 9, p. 340–346, 2000.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L.; BERNARDO, F. M. A. *Bacillaceae* spores, fungi and aflatoxins determination in honey. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 546, p. 85–88, 2003.

MARTINS, N.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 1–12, 2016.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365–373, 2011.

MEINEN, N.; CAMILLERI, L.; ATTARD, E.. The antioxidant activity of maltese honey. **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 1, p. 51–60, 2014.

MENDES, C. G. et al. As análises do mel: revisão. **Revista Caatinga**, v.22, n.2, p.07-14, 2009.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Identification of phenolic acids and flavonoids in monofloral honey from Bangladesh by high performance liquid chromatography: determination of antioxidant capacity. **BioMed research international**, 2014.

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

MORENO-GONZÁLEZ, D. et al. Determination of aminoglycosides in honey by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry and extraction with molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 321-328, 2015.

MURKOVIC, M. **Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis**. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRÁ F. (Ed.) *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford: Elsevier, 2016. p. 346 – 351.

NASCIMENTO A. et al. Physical-chemical parameters of honey of stingless bee (Hymenoptera: Apidae). **American Chemical Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 139-149, 2015.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

NOGUEIRA-NETO, P. et al. **Biologia e manejo das abelhas sem ferrão**. São Paulo: Tecnapis, 1986. 54p.

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

OLIVEIRA, A. **Centro de produção técnicas** - capacitação profissional a distancia/ curso de apicultura. Disponível em: <<http://www.cpt.com.br/cursos-criacaodeabelhas/artigos/abelhas-anatomia>>. Acesso em: 21 jun. 2015.

OLIVEIRA, E. N. A de.; SANTOS, D. da C. Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa. **Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 2, p.132-8, 2011.

OLIVEIRA, F. F. et al. **Guia ilustrado das abelhas “sem ferrão” das reservas de Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tefé: IDSM, 2013. 267p.

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

OLIVEIRA, M. P. **Abelha branca, moça branca, breu (*Frieseomellita varia*)**, 2011. Disponível em: <<http://www.meliponarioreidamandacaia.com/2011/02/abelha-branca-frieseomellita-varia.html>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

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

OLIVER, J. C.; GERMANO, J. L.; VEIGA, S. M. O. M. Eficiência de sanificantes alternativos sobre frutos contaminados artificialmente com *Escherichia coli*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 351-359, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos - Componentes de Alimentos e Processos**. vol. 1. Editora: Artmed. Porto Alegre. 2005. 294p.

OTA, M.; KOHMURA, M.; KAWAGUCHI, H. Characterization of a new maillard type reaction product generated by heating 1-deoxymaltulosyl-glycine in the presence of cysteine. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**. v. 54, p. 5127-5131, 2006.

OUCHEMOUKH, S. et al. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. **Food Chemistry**. v. 121, p. 561–568, 2010.

PEREIRA, F. M. et al. **Manejo de colônias de abelhas-sem-ferrão**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2012. 31p.

PERNA, A. et al. Metal content of southern Italy honey of different botanical origins and its correlation with polyphenol content and antioxidant activity. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 9, p. 1909-1917, 2012.

PETRETTO, G. L.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C. Phenolic content, antioxidant and physico-chemical properties of Sardinian monofloral honeys. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 2, p. 482-491, 2015.

PONTARA, L. P. M. et al. Physicochemical and microbiological characterization of cassava flower honey samples produced by africanized honeybees. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 32, p. 547-552, 2012.

PRASAIN, J. K. **Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles**. Rijeka: InTech, 2012. 788p.

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

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

RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. Flavonoids in Health and Disease. In: FLEURIET, A., MACHEIX, J.-J. (Ed.). **Phenolic Acids in Fruits and Vegetables**. New York: Marcel Dekker. 2003. 1-43 p.

RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples Original Research Article. **Talanta**, v. 93, p. 62-66, 2012a.

RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. **Food Chemistry**, v, 133, p. 1640-1645, 2012b.

RIZELIO, V. M. et al. Fast determination of cations in honey by capillary electrophoresis: A possible method for geographic origin discrimination Original Research Article. **Talanta**, v. 99, p. 450-456, 2012c.

ROVIO, S.; SIRÉN, K.; SIRÉN, H. Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids, and carbohydrates in some Pinot Noir red wines. **Food Chemistry**, v. 24, p. 1194-1200, 2011.

SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125-131, 2015.

SERGIEL, I.; POHL, P.; BIESAGA, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 145, p. 404-408, 2014.

SHEPPARD, W. S. et al. Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. **Apidologie**, v. 22, n. 6, p. 643-652, 1991.

SILICI, S.; SAGDIC, O.; EKICI, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. **Food Chemistry**. v. 121, p. 238–243, 2010.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, Pernambuco, v. 29, p.10–18, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p.144-158, 1965.

SKOOG, D. A. et al. Fundamentos de Química Analítica, Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SLAA, E. J. et al. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 293-315, 2006.

SMANALIEVA, J.; SENGE, B. Analytical and rheological investigations into selected unifloral German honey. **Europe Food Research Technology**, v.229, p. 107-113, 2009.

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

SOLDATKIN, O. O. et al. Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose. *Talanta*. v. 115, p. 200–207, 2013.

SOUSA, J. M. B. et al. Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1765-1774, 2013.

SOUZA, B. A. et al. Caracterização do mel produzido por espécies de *Meliponae*, 1806 (Apidae: Meliponini) da região nordeste do Brasil: características físico-químicas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 303-308, 2009.

SOUZA, D. C.; SILVEIRA, A. Mel de boa qualidade exige cuidados. Belo Horizonte: Empresa Brasileira de Pesquisa de Minas Gerais. Informe Agropecuário, 149, 1987.

SUBRAMANIAN, R.; UMESH HEBBAR, H.; RASTOGI, N.K. Processing of Honey: A Review. **International Journal of Food Properties**, v. 10, n. 1, p. 127-143, 2007.

SUNTORNUSUK, L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 27, p. 679–698, 2002.

TAYLOR, O. R. Neotropical African Bees. In: RESH, V. H.; CARDE, R. T. (Ed.). **Encyclopedia of Insects**. San Diego: Elsevier, 2009. p. 686-688.

TERABE, S. et al. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 111-113, 1984.

TORNUK, F. et al. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. **Industrial Crops and Products**. v. 46, p. 124– 131, 2013.

TOSI, E. A. et al. Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. **LWT-Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 669-678, 2004.

TRAUTVETTER, S.; KOELLING-SPEER, I.; SPEER, K. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. **Apidologie**. v. 40, p. 140–150, 2009.

TRUCHADO, P. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis allows the simultaneous characterization of C-glycosyl and O-glycosyl flavonoids in stingless bee honeys. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 42, p. 7601-7607, 2011.

TRUCHADO, P. et al. Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, 8815–8824, 2008.

TURHAN, I. et al. Quality of honeys influenced by thermal treatment. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1396-1399, 2008.

TURKMEN, N. et al. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 653-657, 2006.

VENIR, E.; SPAZIANI, M.; MALTINI, E. Crystallization in “Tarassaco” Italian honey studied by DSC. **Food Chemistry**. v. 122, p. 410–415, 2010.

VENTURIERI, G. A. et al. **Caracterização, colheita, conservação e embalagem de méis de abelhas indígenas sem ferrão**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2007. 51p.

VIEIRA, L. R. **Estudo da descristalização térmica do mel sob influência da agitação**. 2012. 188p. Dissertação (Mestrado) – Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

VILLAS-BÔAS, J. K.; MALASPINA, O. Parâmetros físico-químicos propostos para o controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**, v. 82, p. 6-16, 2005.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPAN), 2012. 95p.

VIT, P. *Melipona favosa* Pot-Honey from Venezuela. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. p. 363-373.

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

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. 629p.

WANG, Y. et al. Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in the Maillard reaction. **Food Chemistry**. v. 115, p. 233–237, 2009.

WANG, X. H.; GHELDOF, N.; ENGESETH, N. J. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 2, p. 96-101, 2004.

WEDMORE, E. The accurate determination of the water content of honeys. **Bee World** v. 36, p. 197–206, 1955.

WITTER, S. et al. Abelhas sem ferrão no Rio Grande do Sul: distribuição geográfica, árvores importantes para nidificação e sustentabilidade regional. **Mensagem Doce**, v. 100, n. 10, 2009.

WOEHL JUNIOR, G. **Abelha mandacaia**, 2010. Disponível em: <[http://www.ra-bugio.org.br/ver\\_especie.php?id=778](http://www.ra-bugio.org.br/ver_especie.php?id=778)>. Acesso em: 21 jun. 2015.

YÜCEL, Y.; SULTANOGLU, P. Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. **Food Bioscience I**. v. 1, p. 16–25, 2013

ZALUSKI, D.; CARPENTER, L.; JANEZKO, Z. The Structure–Activity Relationships of Plant Secondary Metabolites with Antimicrobial, Free Radical Scavenging and Inhibitory Activity toward Selected Enzymes. In: RAHMAN, A. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 217 - 249.

ZHONG, J. J. Plant Secondary Metabolites. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 299 - 308.

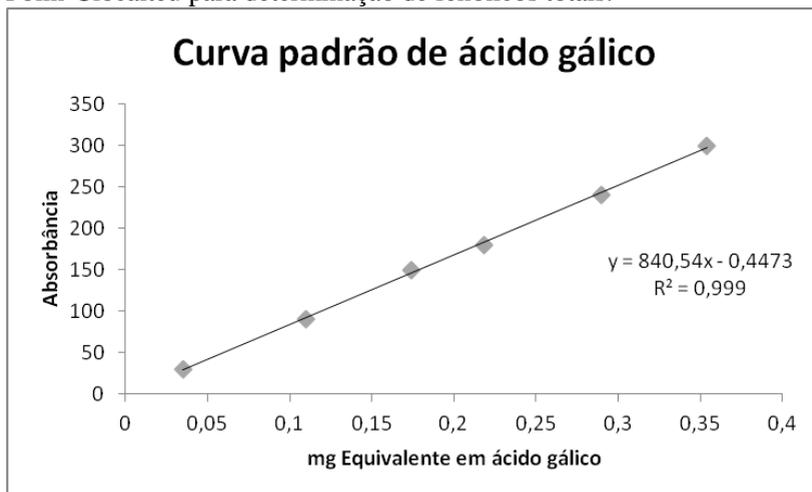
ZHOU, J. et al. Floral classification of honey using liquid chromatography–diode array detection–tandem mass spectrometry and chemometric analysis. **Food chemistry**, v. 145, p. 941-949, 2014.

ZHOU, J. et al. Protective effects of buckwheat honey on DNA damage induced by hydroxyl radicals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2766-2773, 2012.

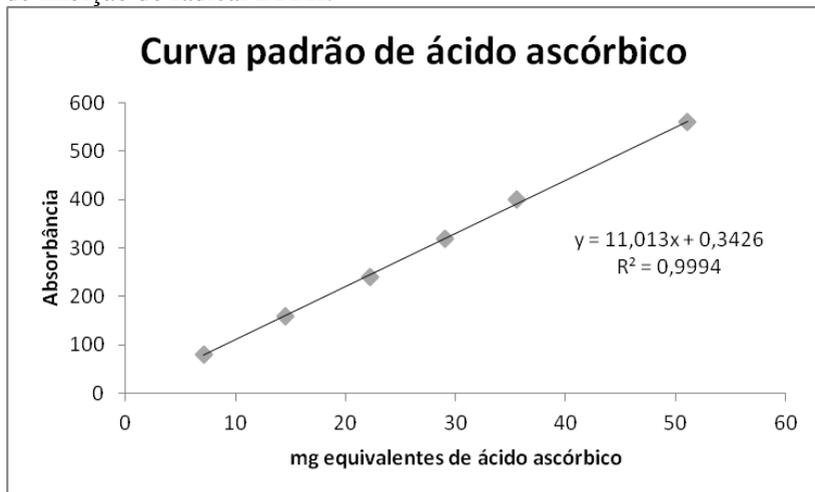
ZULUAGA-DOMÍNGUEZ, C. M. et al. An electric nose and physicochemical analysis to differentiate Columbian stingless bee pot-honey. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. p. 417-427.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A** – Curva padrão de ácido gálico utilizado no método de Folin-Ciocalteu para determinação de fenólicos totais.



**APÊNDICE B** – Curva padrão de ácido ascórbico utilizado no método de inibição do radical DPPH.



**APÊNDICE C** – Curva padrão de sulfato ferroso heptahidratado utilizado no método do poder de redução do ferro (FRAP).

