

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO  
DA REGIÃO CENTRO-OESTE**

MARIANA REZENDE FRAGOSO

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E FUNCIONAL DE MÉIS DO ESTADO DE MATO  
GROSSO DO SUL**

CAMPO GRANDE

2017

MARIANA REZENDE FRAGOSO

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E FUNCIONAL DE MÉIS DO ESTADO DE MATO  
GROSSO DO SUL**

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Braga Neto  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raquel Pires Campos  
Área de concentração: Tecnologia e Saúde  
Linha de Pesquisa: Metabolismo e Nutrição

CAMPO GRANDE

2017

*A todas as mulheres que um dia ousaram correr com os lobos,  
as que estão aqui e as que virão depois, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Toda minha gratidão à força superior do universo, que permite que haja vida e luz, que cada coisa se manifeste em seu devido lugar.

Agradeço a minha família, meu pai Fragoso, minha mãe Irany, irmã Carolina e cunhado Gilson que com todo amor, me proporcionaram a oportunidade de buscar meus objetivos e sempre me inspirando a ser um ser humano melhor, família, vocês são minha base, vocês são meu lar. Meu agradecimento aos amigos que estiverem comigo durante esse tempo todo que passou. Todo meu amor pra Ju, Andrey, Thata, Mirelly, e suas famílias que adoro, a toda turma do ponto verde, amigos/irmãos que a Farmácia UFMS deu de presente, em especial ao Hino, Vanessa, Paty, Uriel, Cacá, Malange, Kauêzão, Tamira, Fer, Marana, Duenté, Maranhão, obrigada!

Minha eterna gratidão aos meus orientadores: professor Dr. José Antônio Braga Neto e professora Dr<sup>a</sup>. Raquel Pires Campos, por todo conhecimento orientação que me passaram, em especial à professora Raquel, que muito me ensinou e compreendeu, cuja parceria desde a graduação sempre foi muito frutífera, uma inspiração enquanto profissional e pessoa. À professora Dr<sup>a</sup>. Luciana Miyagusku, que sempre pude contar e que deu orientações indispensáveis para a realização das análises microbiológicas no trabalho, muito acolhedora com minhas dúvidas e solicitações, também uma inspiração para mim, meu muito obrigada. A professora Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Falcão Gomes, pessoa cujas contribuições foram muito úteis em meu projeto que também me recebeu de braços abertos, fica minha gratidão.

À mestre Fabíola Brandão, por gentilmente se dispor a me ensinar e acompanhar em algumas metodologias desenvolvidas neste trabalho e ao mestre Denis Okoba por também me tirar dúvidas importantes, também fica meu muito obrigada. Agradeço muitíssimo também a toda família 'DTA' que mais que colegas durante a execução deste trabalho senti que se tornaram amigos, em especial aos queridos Osmar, Lúcia, Ulana, Camila, Mariana, Aline, Maurício e Márcio, que sempre deram uma super força nos meus experimentos, cuja convivência foi um presente. Sou grata à mestre Daniela Arakaki e ao professor Dr. Manoel Mendes Ramos Filho por todas as grandes contribuições na banca de qualificação. Meu muito obrigada também a professora Dr<sup>a</sup>. Priscila Hiane, pelo auxílio na fase da escrita do projeto, sempre sendo muito querida. Gostaria de agradecer também a Dara, aluna de iniciação científica que participou do projeto sempre com entusiasmo e a Ariadne Barbosa, pela expertise na parte da análise polínica, indispensável ao trabalho.

Ao apiário Vovô Pedro/MS e a Agro HB/MS pela parceria na disposição das amostras beneficiadas para o estudo. Ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste pela oportunidade lindíssima de fazer parte desse conceituado programa e à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

## Abstract

Honey is a food of complex composition very appreciated by man since ancient times. The aim of this work was to evaluate honeys produced in the State of Mato Grosso do Sul. Honeys were obtained in plastic polyethylene packages ready for commercialization of the monofloral types of grape vine and aroeira and polifloral honey from Apiário Vovô Pedro, in Campo Grande/MS, and polifloral honey benefited in Bodoquena / MS from AgroHB. Three samples of each type of honey were sent to the Food Technology and Public Health Unit (UTASP / CCBS) of the UFMS, placed in hygienized styrofoam boxes stored in a room with a refrigerated temperature circa 20°C, far from source, direct light, where physical-chemical analysis of honey identity and quality of *Apis mellifera* (BRASIL, 2000), evaluation of the antioxidant potential and content of bioactive compounds (total phenols, tannins and vitamin C), determination of the coloration, pollen analysis, and evaluation of the antimicrobial activity with the use of the strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella spp.*, For observation of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial (CBM). The identity and quality analyzes performed on honey presented 100% compliance in all parameters, attesting to the good quality of the evaluated honey, which is a result of effective production processes and compliance with the legislation in force with the consumer. The samples presented color classification as extra-light amber for the samples of honey of grape-vine and light-amber for the others. Pollen analysis revealed a disagreement between the pollen types found in the samples and the information on the labels, with a predominance of the *Schinus terebinthifolius* floral types., red aroeira, and *Myracrodruon urundeuva*, black aroeira. The antioxidant potential and bioactive content found in the samples were considered relevant because they presented values that were sometimes higher than those found in the literature, however the polifloral declared honeys were higher statically. The antimicrobial activity of the honeys against strains of *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella spp.* It was obtained after bacterial formation and subsequent deep inoculation of the results in significant inhibitions, with inhibition halos with performance close to the antibiotic of choice (azithromycin) for *E. coli* and *Salmonella sp.* *S. aureus* presented higher resistance to the honeys of the study. Most of the samples had only inhibitory effect against the strains of the study, with MIC ranging from  $0.795 \pm 0.013$  to  $0.098 \pm 0.001$  mg mL<sup>-1</sup> and only the samples of declared of grapevine and Campo Grande polifloral against *E. Coli* and polifloral from Bodoquena against *Salmonella spp.* Presented MBC at concentrations of  $0.394 \pm 0.006$ ,  $1.563 \pm 0.003$  and  $0.382 \pm 0.005$  mg mL<sup>-1</sup> respectively. Therefore, it is possible to observe an interesting antioxidant and antimicrobial activity in the samples, where there are indications of the presence of compounds with such characteristics, having a great potential of use of *Apis mellifera* honeys produced in Mato Grosso do Sul.

**Key words:** Pollen, anti-bacterial agents, antioxidant activity.

## Resumo

O mel é um alimento de composição complexa muito apreciado pelo homem desde tempos antigos. Este trabalho tem por objetivo avaliar méis produzidos no Estado de Mato Grosso do Sul. Foram obtidos méis em embalagens plásticas de polietileno prontas para comercialização dos tipos monoflorais de cipó-uva e aroeira e mel silvestre do Apiário Vovô Pedro, em Campo Grande/MS, e mel silvestre beneficiado em Bodoquena/MS da AgroHB. Três amostras de cada tipo de mel foram encaminhadas para a Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (UTASP/CCBS) da UFMS, acondicionadas em caixa de isopor higienizada armazenadas em sala com temperatura refrigerada em torno de 20°C, longe de fonte de luz direta, onde foram realizadas análises físico-químicas de identidade e qualidade do mel de *Apis mellifera* (BRASIL, 2000), avaliação do potencial antioxidante e teor de compostos bioativos (fenóis totais, taninos e vitamina C), determinação da coloração das amostras e análise polínica das mesmas, além da avaliação da atividade antimicrobiana com a utilização das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, para observação da concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM). As análises de identidade e qualidade realizadas nos méis apresentaram 100% de conformidade em todos os parâmetros, atestando boa qualidade dos méis avaliados, que é resultado de processos produtivos eficazes e respeito a legislação vigente a ao consumidor. As amostras apresentaram coloração classificadas como extra âmbar-claro para as amostras de mel de cipó-uva e âmbar-claro para as demais. A análise polínica revelou uma discordância entre os tipos polínicos encontrados nas amostras e as informações trazidas nos rótulos, com predominância dos tipos florais *Schinus terebinthifolius*, aroeira vermelha, e/ou *Myracrodruon urundeuva*, aroeira preta. O potencial antioxidante e teor de bioativos encontrados nas amostras foram considerados relevantes por apresentarem valores por vezes maiores aos encontrados na literatura, entretanto os méis declarados silvestres foram superiores estaticamente. A atividade antimicrobiana dos méis frente as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella spp.* foi obtida após o plaqueamento das bactérias e posterior inoculação em profundidade dos méis resultando em inibições significativas, com halos de inibição com desempenho próximo do antibiótico de escolha (azitromicina) para *E. coli* e *Salmonella sp.* *S. aureus* apresentou maior resistência aos méis do estudo. A maior parte das amostras apresentou apenas efeito inibitório frente as cepas do estudo, com CIM que variou entre  $0,795 \pm 0,013$  a  $0,098 \pm 0,001$  mg mL<sup>-1</sup> e apenas as amostras de méis declarados de cipó-uva e silvestre Campo Grande frente a *E. coli* e silvestre proveniente de Bodoquena contra *Salmonella spp.* apresentaram CBM, nas concentrações de  $0,394 \pm 0,006$ ,  $1,563 \pm 0,003$  e  $0,382 \pm 0,005$  mg mL<sup>-1</sup> respectivamente. Portanto, pode-se observar uma interessante atividade antioxidante e antimicrobiana nas amostras, onde há indícios da presença de compostos com tais características, havendo um grande potencial de uso dos méis de *Apis mellifera* produzidos em Mato Grosso do Sul.

**Palavras-chave:** Pólen, antibacterianos, atividade antioxidante.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>10</b>
2.1. Mel: produção e consumo.....	10
2.2. O mel em Mato Grosso do Sul.....	12
2.3. Abelhas melíferas.....	13
2.4. Mel de <i>Apis mellifera</i> .....	14
2.4.1. Definição de acordo com a legislação do Brasil.....	14
2.4.2. Composição do mel.....	17
2.4.3. Micronutrientes do mel.....	20
2.4.4. Propriedades funcionais - Atividade antioxidante do mel.....	22
2.4.5. Atividade antimicrobiana do mel.....	24
2.4.6. Microrganismos patogênicos causadores de doenças veiculadas por alimentos .....	25
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
4.1. Material.....	28
4.2. Análises físico-químicas.....	30
4.2.1. Umidade e sólidos solúveis.....	30
4.2.2. Resíduo mineral fixo (cinzas).....	30
4.2.3. Glicídios redutores, em glicose.....	31
4.2.4. Glicídios não-redutores, em sacarose.....	31
4.2.5. Determinação de valor de pH.....	31
4.2.6. Teor de acidez.....	31
4.2.7. Teor de Hidroximetilfurfural (HMF).....	31
4.2.8. Sólidos insolúveis em água.....	31
4.2.9. Métodos de detecção de fraudes: reações de Lund e Lugol.....	31
4.2.10. Atividade da enzima diastásica (método qualitativo).....	32
4.2.11. Análise de cor.....	32
4.3. Análise melissopalínológica .....	32
4.4. Compostos bioativos.....	33

4.4.1. Preparo das amostras para atividade antioxidante, teor de fenóis totais e taninos.....	33
4.4.2. Determinação da atividade antioxidante.....	33
4.4.3. Quantificação de fenóis totais.....	33
4.4.4. Quantificação de taninos.....	33
4.4.5. Teor de ácido ascórbico (vitamina C).....	34
4.5. Atividade antimicrobiana.....	34
4.5.1. Teste de inibição do crescimento bacteriano pela difusão em ágar.....	34
4.5.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	35
4.6. Análise estatística.....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
5.1. Análises físico-químicas.....	35
5.2. Análise de cor e melissopalínológica.....	40
5.3. Compostos bioativos.....	44
5.4. Teste de inibição bacteriana por difusão em ágar .....	46
5.5. Teste da microdiluição para determinação da CIM e CBM.....	49
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade de mel de abelhas <i>Apis mellifera</i> para mel floral.....	17
<b>Tabela 2</b> – Composição média de minerais e vitaminas no mel de abelhas <i>Apis mellifera</i> .....	21
<b>Tabela 3</b> – Classificação do mel de acordo com escala de Pfund.....	32
<b>Tabela 4</b> – Parâmetros físico-químicos das amostras de mel de <i>Apis mellifera</i> produzidas em Mato Grosso do Sul.....	36
<b>Tabela 5</b> – Classificação da coloração de acordo com escala de Pfund, dos méis produzidos em Mato Grosso do Sul.....	40
<b>Tabela 6</b> – Composição polínica das amostras de méis produzidos em Mato Grosso do Sul.....	41
<b>Tabela 7</b> – Valores médios de IC <sub>50</sub> (µg. mL <sup>-1</sup> ) Fenóis totais (EAG mg.100 g <sup>-1</sup> ) e Taninos (EAT mg.100 g <sup>-1</sup> ) em méis do estado de Mato Grosso do Sul.....	44
<b>Tabela 8</b> – Halos de inibição do crescimento bacteriano (mm), das amostras, azitromicina e mel artificial frente as cepas do estudo.....	47
<b>Tabela 9</b> – Halos de inibição (mm) das cepas frente a azitromicina (azt).....	48
<b>Tabela 10</b> - Concentrações das amostras diluídas que promoveram efeito bactericida (CBM) e bacteriostático (CIM) em mg. mL <sup>-1</sup> .....	49

## Lista de figuras

- Figura 1** – Amostras de méis monofloral de Cipó-uva, cedidas pelo apiário Vovô Pedro (Campo Grande – MS). No estudo cada amostra foi nomeada CP1, CP2 e CP3.....28
- Figura 2** – Amostras de méis monofloral de Aroeira, cedidas pelo apiário Vovô Pedro (Campo Grande – MS). No estudo cada amostra foi nomeada A1, A2 e A3.....29
- Figura 3** – Amostras de méis Silvestres, cedidas pelo apiário Vovô Pedro (Campo Grande – MS). No estudo cada amostra foi nomeada SCG1, SCG2 e SCG3.....29
- Figura 4** – Amostras de méis silvestres, cedidas pela Agro HB (Bodoquena – MS). No estudo cada amostra foi nomeada SBDQ1, SBDQ2 e SBDQ3.....30
- Figura 5** - Fotomicrografias em microscopia óptica de grãos de pólen coletados por *Apis mellifera*, nas amostras de méis produzidos em Mato Grosso do Sul, nos anos de 2015 e 2016.....44
- Figura 6** – Halos de inibição de crescimento de *Staphylococcus aureus* em ágar Mueller-Hinton (MH) .....52
- Figura 7** – Halos de inibição de crescimento de *Escherichia coli*. Em Mueller-Hinton (MH).....53
- Figura 8** – Halos de inibição de crescimento de *Salmonella spp.* em ágar Mueller-Hinton (MH).....54

## 1. Introdução

O mel é um alimento muito apreciado desde os tempos antigos e ao longo dos séculos o homem foi aprendendo e aprimorando o manejo de colmeias, instalando-as em locais apropriados, aumentando a produtividade das abelhas e também a extração de outros produtos apícolas, prática aperfeiçoada denominada apicultura (EMBRAPA, 2002). Possui inúmeras aplicações, sendo um dos mais antigos conservadores de alimentos em função da alta concentração de açúcares e baixa atividade de água (MOURA, 2010), além de um teor reduzido de conteúdo proteico e alta acidez (SILVA et al., 2006).

Trata-se de um alimento de composição complexa, constituído de água, frutose, glicose, sacarose, maltose e outros dissacarídeos, sais minerais, vitaminas, enzimas, hormônios, proteínas, ácidos, aminoácidos e inúmeros outros compostos. Bastante nutritivo, de fácil digestibilidade e com diversas aplicações terapêuticas, um alimento com poucas restrições e indicado para todas as idades (BACAXIXI et al., 2011).

No Brasil há legislação específica para o mel produzido pela espécie *Apis mellifera*, Instrução Normativa nº 11/2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), de modo que os requisitos de identidade e qualidade do mel são fundamentais para o regimento da produção e comercialização do produto, padronizando vários parâmetros físico-químicos e conseqüentemente o tornando seguro para o consumidor (BRASIL, 2000).

Muitas substâncias presentes no mel são responsáveis pelo caráter antimicrobiano e antioxidante, cujo consumo deve ser estimulado pois além das qualidades terapêuticas, se trata de um alimento nutritivo e funcional. Diversos fatores influenciam a florada de origem, como época do ano, regime de chuvas, localização geográfica e tipo de solo interferindo diretamente no teor de inúmeras substâncias nas plantas, e que através do néctar coletado pelas abelhas, farão parte da complexa composição do mel (BORSATO et al., 2009).

A atividade funcional de méis está relacionada ao seu conteúdo de substâncias bioativas que desempenham funções desejáveis no organismo, composição esta que é a parte mais variável no mel. A presença de compostos fenólicos fornece a quem consome antioxidantes naturais, que neutralizam radicais livres danosos, auxiliando a prevenção de doenças e desacelerando o envelhecimento (SCHRAMM et al., 2003).

A atividade antimicrobiana dos méis está relacionada às suas propriedades físico-químicas, como baixa atividade de água e alta osmolaridade, em virtude ao alto teor de açúcares, e elevada acidez, bem como a presença de substâncias que possuem ação direta sobre microrganismos patogênicos (MOLAN, 1999). O teor de compostos

fenólicos oriundos do metabolismo secundário das plantas que compõe o mel está diretamente relacionado a atividade antimicrobiana (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010). Méis mais ricos em compostos fenólicos tendem a apresentar maior atividade antimicrobiana e coloração mais escura, devido maior complexidade na composição (LACERDA et al., 2010).

Tem havido grande esforço na articulação da cadeia produtiva apícola e pesquisas dos méis, devido sua relação com a conservação ambiental, polinização de culturas agrícolas e desenvolvimento econômico, além de ser uma ótima opção para agricultura familiar e apresentar grande potencial de consumo no mercado interno (QUEIROGA et al., 2015).

Tendo em vista as vantagens da produção e consumo do mel, e a pouca literatura disponível a respeito dos méis produzidos em Mato Grosso do Sul, este trabalho teve por objetivo estudar a composição de méis silvestres e monoflorais para fornecer informações valiosas sobre os parâmetros de qualidade físico-química perante a legislação brasileira, a origem polínica e presença de compostos com ação antioxidante e antimicrobiana.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 – Produção e consumo do mel

Segundo dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação FAO (2011), no ano de 2009 no mundo foram produzidas 897.950 toneladas de mel, com a China liderando com 367.219 toneladas e o Brasil em 9º lugar com a produção 38.764 toneladas.

Em 2006 a Europa, um dos principais mercados do mel brasileiro na época, impôs um embargo ao mel produzido no país, pois não respeitava as políticas higiênic-sanitárias e de rastreabilidade exigidas pela União Europeia. Houve maior oferta no mercado interno brasileiro, o que resultou na queda do preço e dificuldade financeira para os apicultores. Porém a restrição imposta resultou na mobilização do setor, no sentido de implementar políticas que atendiam aos mercados mais exigentes, tornando o produto novamente competitivo e valorizado no exterior e, no ano de 2008 o Brasil retornou ao mercado europeu com produtos de qualidade superior ao oferecido anteriormente (TERNOSKI et al., 2009).

Nos anos de 2011 e 2012 houve uma queda de 19,3% na produção apícola brasileira, elevando o preço do produto de R\$ 5,96 Kg para R\$ 7,11 Kg em média, sendo os estados da região sul responsáveis por 49,1% da produção nacional nesse período (IBGE, 2013). Segundo a Associação Brasileira de Exportadores de Mel, ABEMEL, (2013) os índices de produção caíram a partir de 2010, por perda de enxames em decorrência de fatores climáticos, em função de uma estiagem na região nordeste, que era maior exportadora.

O potencial apícola brasileiro é reflexo de sua flora diversa (inúmeros biomas), climas variados e amplo território, permitindo haver produção apícola durante o ano, diferente de outros países, cuja produção está condicionada a localidades específicas e determinadas épocas do ano (QUEIROGA et al., 2015)

O consumo do mel é bastante heterogêneo no mundo. Países como os Estados Unidos e componentes da União Europeia apresentaram consumo médio de 1 Kg/habitante/ano de mel, não obstante, também figuram entre os maiores importadores do produto (AROUCHA et al., 2008). No Brasil, as classes média e alta perfaziam o consumo médio de 250 a 300 g/habitante/ano, no entanto a região Sul apresentava o maior consumo médio do país, com 400 g/habitante/ano, e o Nordeste, o menor com cerca de 150 g/habitante/ano (NETO e NETO, 2005).

Para Queiroga et al. (2015), a apicultura brasileira tem se modernizado, tornando os produtos mais atrativos aos mercados internacionais, o que gera, indiretamente um

aumento do preço no mercado interno, pois a produção se concentra na exportação. O preço elevado é um fator proibitivo para muitas famílias brasileiras, onde o consumo de produtos apícolas é menor.

No Brasil, o mel é bastante consumido como remédio para diversos fins, com vasta aplicabilidade medicinal, muito utilizado para tratamento do trato respiratório, com poder cicatrizante, hidratante e emoliente, para amenizar sintomas de gripes e resfriados, principalmente em regiões mais afastadas de grandes centros onde o produto é por vezes ingrediente principal de receitas da medicina popular (BORSATO, 2013).

Possui grande aplicabilidade industrial, como aditivo com diversos fins na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética. Devido a suas propriedades edulcorantes, sendo conservante natural com propriedades antibióticas e antissépticas, no setor alimentício o mel tem sido largamente empregado na produção de bebidas alcoólicas, na panificação e produção de doces em geral. Grande parte das patentes depositadas do uso industrial do mel associado ao álcool está no setor farmacêutico e alimentício (GUEZ et al., 2013).

## 2.2 – O mel em Mato Grosso do Sul

Dados fornecidos por Buainain e Batalha (2007) indicavam que apesar de possuir um grande potencial na exploração da atividade apícola e ser o maior produtor do Centro-Oeste, com quase metade da produção (41%), o estado contribuía apenas com 1,3% da produção brasileira.

Mato Grosso do Sul congrega em seu território diversos biomas, desde áreas que compreendem o Cerrado, com suas variações dependendo da localização geográfica, relevo e clima até pontos com vegetação típica de mata atlântica, elementos de floresta tropical (amazônica) além do ecossistema do Pantanal e suas diferentes nuances. A apicultura é uma atividade que necessita de certo grau de preservação ambiental, uma vez que deve haver flora que serve de alimento para as abelhas, e estes insetos desempenham o papel de polinizadoras, contribuindo para a conservação dos ecossistemas os quais estão inseridas (REIS, 2003).

Outro ponto interessante para o estímulo da atividade no estado, é atrelar o apelo do produto proveniente de pequenos produtores, que no país perfazem cerca de 85% dos produtores de mel (REIS, 2003) com um mel produzido a partir de floradas (silvestres ou não) que estão inseridas em biomas únicos no mundo, levando ao consumidor um produto que além de ser nutritivo e saudável, contribui para o desenvolvimento de pequenas comunidades e apicultores, além de promover a preservação de ecossistemas inteiros, diminuindo o desmatamento, poluição e contribuindo também para valorização cultural das localidades produtoras. Vale salientar ainda, que a apicultura é uma atividade que fornece outros produtos: apitoxina, cera, geleia real e própolis que possuem propriedades tecnológicas na indústria em geral e para fins terapêuticos diversos (WIESE, 1995).

Com produção aproximada de 600 toneladas de mel por ano e em torno de 1,3 mil apicultores (FEAMS, 2010) o estado de Mato Grosso do Sul concentrou grande parte da produção nos municípios de Chapadão do Sul, Costa Rica e Cassilândia, o fomento a atividade levou a articulação dos produtores para elevação do padrão de qualidade do produto (COIADO, 2011). Outros municípios com produção expressiva no estado: Dourados e Iguatemi, com produção média de 150 toneladas/ano; e com menor produção: Três Lagoas, Paranaíba, Nova Andradina e Bodoquena (IBGE, 2010).

Ainda com pouca visibilidade, a produção apícola no Pantanal possui um grande potencial a ser explorado, uma vez que possui grande variedade de flora apreciada pelas abelhas melíferas, florada essa que muitas vezes só ocorre nas regiões pantaneiras (COIADO, 2011). A região conta com cerca de 162 espécies com potencial apícola, pertencentes a 54 famílias botânicas. Dentre as espécies destacam-se: o baru

(*Dipteryx alata* Vog.), hortelãzinha (*Hyptis lappacea* Benth.), vick (*Bacopa* sp.), Assa-peixe (*Vernonia scabra* Pers.) e tarumeiro (*Vitex cymosa* Bert.) (POTT e POTT, 1986). Um estudo mais recente, relaciona ainda dentre as floradas mais procuradas por abelhas apícolas as espécies: lixeira (*Curatella americana*), capitão (*Terminalia argentea*) (COIADO, 2011). Destacadamente o Pantanal apresenta abundância de abelhas e ausência de agrotóxicos, com potencial para atingir destaque na produção nacional (FERREIRA, 2013).

### 2.3 – Abelhas melíferas

As abelhas são insetos pertencentes à ordem *Hymenoptera*, dentro da família *Apidae*, família esta, que congrega as abelhas produtoras de mel, sendo elas portadoras ou não de ferrão (GALLO et al., 2002).

O gênero *Apis* congrega abelhas melíferas portadoras de ferrão, e todas as espécies pertencentes a ele que são encontradas no território nacional são exóticas. Segundo Wiese (1995), espécies europeias foram trazidas por clérigos no período colonial, sendo elas: *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica*, *Apis caucasica* e *Apis mellifera mellifera*, cuja produtividade era baixa. Em 1956 chegou ao país, a espécie africana, *Apis mellifera scutellata*, bastante agressiva e irritadiça, que após o cruzamento com as abelhas de origem européia, formou um híbrido bastante resistente às condições climáticas e doenças, menos agressivas que a espécie africana e mais produtiva. Até esse momento, o mel produzido no país era das abelhas nativas ditas sem ferrão (principais gêneros: *Nanotrigona* e *Tetragonisca*). O pesquisador Dr. Warwick Estevam Kerr, com o aval do Ministério da Agricultura, trouxe da África as abelhas nativas para estudos, mas as abelhas de 26 colônias escaparam do centro de pesquisa, havendo assim o cruzamento acidental com as espécies presentes no país, dando origem as abelhas africanizadas (PEREIRA, 2011).

A consequência mais aparente do cruzamento das espécies exóticas foi um aumento expressivo na produção apícola no país, que antes do processo de africanização oscilava entre três e cinco mil toneladas ao ano, cenário que em poucas décadas viabilizou a produção média de 40 mil toneladas por ano do produto apícola (GONÇALVES, 1994; OLIVEIRA e CUNHA, 2005). Diversos estudos procuram mensurar o real impacto do processo de africanização no Brasil e também em diversas regiões do continente americano, uma vez que as abelhas africanas se adaptaram muito bem a climas mais quentes e baixas altitudes (KERR, 1989), no que diz respeito a competição com as abelhas nativas, sobretudo no processo de polinização de espécies vegetais nativas em ambientes naturais (SILVEIRA et al., 2002).



As abelhas oriundas desse processo de hibridização são as responsáveis pelo salto no desenvolvimento da apicultura brasileira, pois são mais resistentes a pragas e doenças, com produtividade considerável e técnicas de manejo já estabelecidas, colocando assim, o país em destaque no comércio internacional do produto (MARTINEZ e SOARES, 2012).

## 2.4 – Mel de *Apis mellifera*

### 2.4.1 – Definição de acordo com a legislação do Brasil

Segundo a Instrução normativa nº11 de 20 de outubro de 2000, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000), que dispõe a respeito do regulamento técnico de identidade e qualidade do mel:

‘Entende-se por mel, o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia.’

A norma vigente de qualidade e identidade do mel, que não se aplica às espécies nativas de abelhas que também produzem mel, que é consumido por povos americanos desde a antiguidade, e no Brasil até a introdução de espécies europeias no período colonial (WIESE, 1995). Nas últimas décadas, tem crescido o interesse científico neste produto, dito mel de meliponíneos onde diversos gêneros são produtores desse tipo de mel, as chamadas abelhas nativas sem ferrão, a fim de elucidar suas composições e estabelecer parâmetros de identidade e qualidade desses méis, cujo uso na medicina popular tradicional os consagra por suas aplicabilidades terapêuticas (CARVALHO et al., 2005). Meliponíneos apresentam uma produtividade inferior a *A. mellifera*, porém, esses méis geralmente têm sabor diferenciado e bastante aromático, com um alto valor agregado ao produto.

O mel produzido por *A. mellifera* é resultado da transformação química e enzimática feita pelas abelhas melíferas, a partir do néctar de flores e/ou outras partes de plantas ou da secreção de insetos que se alimentam desses exsudatos das plantas (BRASIL, 2000). O mel obtido a partir das secreções de plantas ou excreção de insetos sugadores de partes vivas das plantas de insetos é conhecido como mel de melato (CAMPOS et al., 2003).

Méis florais são classificados de acordo com a florada utilizada como substrato pelas abelhas, assim pode ser monofloral ou silvestre (multifloral ou polifloral) a partir do conteúdo de pólen de determinada origem que apresenta. Méis ditos monoflorais são aqueles que contêm acima de 45% de pólen proveniente de uma única espécie (MATEO e BOSH-REIG, 1998), ficando restritos aos períodos de floração da espécie de interesse. O mel silvestre é aquele que não possui predominância de uma única espécie floral, sendo elas nativas, apresentando maior variabilidade durante o ano e características físico-químicas e sensoriais mais diversificadas (BERA, 2010).

A caracterização do mel de acordo com a presença dos tipos polínicos é denominada análise melissopalínológica, que identifica os pólenes presentes nos méis, o que traz informações a respeito da preferência florística das abelhas, além de ser indicativo da vegetação apícola de determinada região e também os períodos de produção de néctar pelas espécies utilizadas como substrato. (BARTH, 1989; DUTRA e BARTH, 1997; BARTH 2005).

Para classificação do mel de acordo com origem botânica do pólen, é necessária confecção de lâminas para microscopia, após preparação adequada do mel, e de acordo com Louveaux e colaboradores (1978) acima de 45% de um tipo de pólen é classificado como pólen dominante (méis monoflorais), de 15 a 45%, trata-se de pólen acessório, de 3 a 15% é pólen isolado importante e de 3 a 1% de ocorrência, trata-se de pólen ocasional, abaixo de 1%, trata-se de pólen traço, cuja presença está associada a pequenas quantidades que aderem ao corpo das abelhas. A análise polínica nos méis é de grande importância no controle de qualidade desse alimento, através dela comprova-se a procedência e é possível detectar adulterações (SODRÉ et al., 2011). Trata-se de um importante parâmetro de qualidade para o mel de abelhas, porém não exigido pela atual legislação e o produtor não se vê obrigado a realizar a análise melissopalínológica, podendo levar ao consumidor uma informação defasada a respeito da origem botânica do mel comercializado.

O mel é um alimento cujo consumo geralmente é *in natura*, tornando indispensável os cuidados durante a colheita e extração, considerando que não haverá nenhum processo capaz de eliminar ou reduzir micro-organismos patogênicos ou deteriorantes, se estiverem no produto. A falta de cuidado pode comprometer a qualidade, influenciando indiretamente a composição físico-química do mel de forma irreversível, comprometendo sua segurança (BRASIL, 1985).

Vale ressaltar que a colheita é a primeira fase crítica para o alcance da qualidade total, sendo o início de um longo processo onde o mel fica vulnerável, em relação às condições ambientais, de manipulação, equipamentos e instalações, até que o produto chegue ao consumidor final (CAMARGO, 2002). Boas práticas de fabricação (BPF) são

um conjunto de princípios e regras para o correto manuseio dos alimentos, que devem ser aplicados desde a origem da matéria-prima, as condições de higiene (dos manipuladores, do ambiente de processamento, instalações e equipamentos), processamento, os procedimentos de limpeza e desinfecção, o controle integrado de pragas (CIP) e as condições de armazenamento e transporte da matéria-prima e dos produtos acabados, sempre buscando garantir a segurança alimentar dos consumidores. É possível verificar se houve um processamento adequado do mel através dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos apresentados, uma vez que o processamento interfere diretamente na qualidade do produto final (ALVES et al., 2013).

Embora o mel seja um produto que em função de suas características físicas e químicas não apresente alta susceptibilidade a proliferação de micro-organismos, fatores externos (ambientais, condições de manipulação e estocagem) pode influenciar negativamente na sua qualidade final (PEREIRA et al., 2003; SILVA, 2007, ALVES, 2013).

## 2.4 2 – Composição do mel

Segundo a Instrução normativa nº11 de 20 de outubro de 2000, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000), o mel deve apresentar parâmetros de padrão de identidade e qualidade para que este produto esteja adequado ao consumo e comercialização, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade de mel de abelhas *Apis mellifera* para mel floral (BRASIL, 2000).

<b>Parâmetro</b>	<b>Mel Floral</b>
<b>Umidade (g .100 g<sup>-1</sup>)</b>	Max. 20
<b>Açúcares Redutores (g .100 g<sup>-1</sup>)</b>	Mín. 65
<b>Sacarose Aparente (g .100 g<sup>-1</sup>)</b>	Máx. 6
<b>Sólidos Insolúveis (g .100 g<sup>-1</sup>)</b>	Máx. 0,1
<b>Minerais (g .100 g<sup>-1</sup>)</b>	Máx. 0,6
<b>Acidez (mEq/Kg)</b>	Máx. 50
<b>Índice de Diastáse na escala de Gothe</b>	Mín. 8 DN
<b>Índice de Diastáse se HMF ↓ a 15</b>	Mín. 3 DN
<b>Hidroximetilfurfural (mg/Kg)</b>	Máx. 60

O mel é composto, majoritariamente por açúcares (diversos mono e oligossacarídeos), e de 85 a 95% do conteúdo de carboidratos é principalmente glicose e frutose, numa proporção ligeiramente maior de frutose 1,2:1 de glicose (CRANE, 1975), tais monossacarídeos, devem perfazer pelo menos 65% da composição do mel comercializado no país. A cristalização é um processo que resulta no aumento acentuado na viscosidade do produto e está relacionado ao conteúdo de glicose: acima de 30% do conteúdo de carboidratos totais, existe a tendência de que o produto cristalize, fator que diminui o interesse do consumidor (CRANE, 1987).

A sacarose presente no mel geralmente encontra-se, segundo Crane (1975) em média, 1,5% de massa, sendo que a legislação brasileira limita sua presença em no máximo 6%, e 15% para mel de melato (BRASIL, 2000). A presença de sacarose acima do permitido pode indicar ação fraudulenta do produto pela adição de xaropes ricos nesse tipo de açúcar, alimentação artificial das abelhas (MENDES et al., 1998), ou mesmo colheita do mel ainda não maduro, que não sofreu transformação ideal pelas enzimas presentes no mel (AZEREDO et al., 1999).

O teor de umidade é um parâmetro de extrema importância para o mel, pois está relacionado a sua estabilidade e durabilidade, e quanto maior no produto, maior a probabilidade de haver fermentação durante o armazenamento (BOGDANOV et

al.,1997). A legislação vigente determina o máximo de 20% de umidade nos méis comercializados, Brasil (2000), e quanto menor, maior é sua estabilidade microbiológica, e, portanto, maior tende a ser sua vida de prateleira, se mantido em condições apropriadas. Altos teores de umidade no mel também contribuem para o aumento da acidez, e indiretamente o aumento dos níveis de hidroximetilfurfural, formado a partir da desidratação ácida dos monossacarídeos presentes (BERA, 2004).

A acidez do mel deve-se a presença de ácidos orgânicos, que podem variar em teor e composição pelas diferentes fontes de néctar, atividade da enzima glicose-oxidase que origina o ácido glucônico e conteúdo de minerais (TERRAB, 2003). Segundo a normativa, Brasil (2000), o máximo permitido é de 50 mEq.Kg<sup>-1</sup>, teores de acidez acima do preconizado costumam indicar uma menor qualidade microbiológica do produto, resultantes da colheita, processamento e/ou armazenamento inadequados do produto, fatores que desencadeiam perda nutricional e menor segurança do alimento ao ser consumido ou até mesmo indicativo de fraudes no mel.

O pH do mel, é um parâmetro de qualidade o qual não é exigido pela legislação, pois já é feita a análise de acidez que é reflexo do pH no mel, mas representa um parâmetro auxiliar para avaliação de identidade e qualidade (CORBELLA e COZZOLINO, 2006). Dessa forma, um mel dentro das condições ideais de produção e consumo apresenta pH ácido, compreendido na faixa de 3,3 a 4,6, que é reflexo de sua composição físico-química. Méis que apresentam pH fora da faixa recomendada podem apresentar outros indícios de fraudes ou mesmo que a qualidade microbiológica não é boa, uma vez que podem estar em processo de fermentação (TERRAB et al., 2004).

Sólidos insolúveis são resíduos presentes no mel que são insolúveis em água, de acordo com a metodologia de análise, como pequenas sujidades de caráter hidrofóbico, resíduos de cera e partes minúsculas que se desprendem do corpo das abelhas. Segundo Brasil (2000) a quantidade máxima deve ser de até 0,1 g.100 g<sup>-1</sup>, ou 0,1% de massa total. Índices acima do exigido, indicam falhas no processamento do produto, como na centrifugação, filtração, decantação ou mesmo contaminação pós-processamento, o que configura um desvio de qualidade do produto (SANTOS e OLIVEIRA, 2013). Este critério está relacionado ao tipo de processamento envolvido, ao passo que a centrifugação resulta em valores de sólidos insolúveis bem inferiores ao limite máximo fixado pela legislação brasileira, sendo uma tendência mundial a diminuição do teor máximo permitido em méis processados que passam pela etapa de centrifugação (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2015).

A partir desses parâmetros, é possível verificar a qualidade do produto além de detectar possíveis fraudes e adulterações, como a mais conhecida, a adição de xaropes ou açúcares ao mel (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2005), que é facilmente

detectada pela presença acima do permitido pela legislação de sacarose e hidroximetilfurfural (HMF). Este último trata-se de um composto encontrado naturalmente no mel, resultante da transformação de açúcares presentes, havendo variação da concentração de acordo com a florada de origem, aquecimento excessivo, um produto antigo ou mesmo aqueles que são mal processados e/ou armazenados, que resulta no aumento da acidez e em consequência dos teores de HMF, além de quando há adição fraudulenta de açúcares e xaropes (MELO et al., 2003).

Para a União Europeia e o *Codex Alimentarius*, o teor máximo do HMF no mel deve ser de no máximo 40 mg por quilo do produto e para méis produzidos em climas tropicais esse valor pode chegar até 80 mg.kg<sup>-1</sup>, temperaturas acima de 30°C tendem a formar com maior rapidez HMF e a legislação brasileira fixa o máximo em 60 mg por quilo de mel (FERREIRA et al., 2014). O estudo do HMF tem recebido bastante atenção da comunidade científica por estar presente em outros alimentos, e por ser um composto que apresenta atividade genotóxica, citotóxica, mutagênica e carcinogênica (SILVA et al., 2008; LEMOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2014).

Segundo Melo e colaboradores (2003) a composição físico-química dos méis é resultado da ação enzimática sobre o substrato utilizado pelas abelhas. São enzimas contidas no néctar proveniente das plantas e também aquelas incorporadas pelas próprias abelhas no processo de formação do mel, responsáveis por caracteres físico-químicos e nutricionais do produto, não somente durante sua produção como também durante o armazenamento. A atividade da enzima diastase (amilase) está relacionada ao teor de sacarose no mel, sendo responsável pela transformação de cerca de três quartos da sacarose em glicose e frutose, dessa forma, quanto mais antigo for o produto, menor tende a ser o conteúdo de sacarose devido a ação da diastase. É um parâmetro de identidade e qualidade do mel, pois a partir da aferição da atividade da enzima, é possível saber se houve aquecimento excessivo, por ser termolábil, ou armazenamento inadequado e/ou prolongado, uma vez que a diastase se deteriora com o tempo.

A legislação prevê, ainda, testes complementares para verificação de possíveis fraudes em méis, sendo eles: reação de Fiehe, Lund e Lugol. O teste de Fiehe tem a finalidade de indicar a presença de compostos oriundos do superaquecimento de açúcares, apontando uma possível adulteração do mel pela adição de xaropes, uma vez que detecta através de análise qualitativa o HMF em excesso na amostra. A reação de lugol aponta a adição de amido e dextrinas ao produto e Lund detecta substâncias albuminoides que são naturais no mel, provenientes do néctar que precipitam ao reagirem com a solução de ácido tânico. A partir dessas análises é possível saber se a amostra de fato é mel de abelhas, ou se houve adulteração do produto durante o

processamento, ambos casos são fraudes e lesam o consumidor que compra o produto como mel de abelhas (BRASIL, 2000).

A normativa determina também a presença obrigatória de grãos de pólen, ausência de aditivos e indícios de fermentação (BRASIL, 2000). Também fixa limites máximos para contaminantes orgânicos e inorgânicos (BRASIL, 2013) e a Normas Higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos/Elaboradores/Industrializadores de Alimentos, segundo a portaria 368 de 1997 (BRASIL, 1997). Desde 2001, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento normatizou os regulamentos técnicos de qualidade e identidade de outros produtos apícolas produzidos pela *Apis mellifera*, sendo eles: apitoxina, cera de abelhas, pólen apícola, geleia real fresca e liofilizada, própolis e extrato da própolis, através da Instrução Normativa número 3, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). São produtos antes encarados como secundários na apicultura, mas que possuem alto valor agregado além de um mercado em franca expansão.

#### 2.4.3 – Micronutrientes do mel

O mel possui micronutrientes em sua composição, derivados dos néctares e exsudatos das plantas visitadas pelas abelhas, resultantes do metabolismo secundário das mesmas, e também de enzimas secretadas pelas abelhas. Tais microelementos estão relacionados com as atividades terapêuticas atribuídas ao mel, tanto as atividades antioxidante como a antimicrobiana (SILVA et al., 2006).

Os ácidos orgânicos presentes no mel são os que dão as características mais marcantes do sabor (SILVA et al., 2006) sendo encontrados em maiores concentrações os ácidos glucônico e cítrico, mas encontra-se também os ácidos acético, butírico, fólico, fórmico, láctico e succínico, cujas concentrações variam e dão a estabilidade do mel (PEREIRA et al., 2003), além disso, cerca de 80 compostos de diferentes classes orgânicas também contribuem para a cor (presença de pigmentos como antocianinas e carotenoides), aroma e sabor (BOGDANOV et al., 2000).

Os pigmentos do mel pertencem às classes dos carotenoides, antocianinas e flavonas. Os níveis de beta-carotenoides em algumas variedades de mel variam de 1,49 a 183,07 g.100 g<sup>-1</sup>, segundo levantamento de Silva e colaboradores (2006).

Apesar de baixo, a composição média de aminoácidos no mel é de aproximadamente 175 mg.100 g<sup>-1</sup>, sendo em até 49% de prolina, que aparece em maior proporção. O conteúdo proteico em méis está relacionado a presença de enzimas que são responsáveis pelas características físico-químicas do mel, sendo as principais: invertase, diastase (amilase), glicose-oxidase, catalase e fosfatase. (SILVA et al., 2006).

Os teores médios de minerais e vitaminas nos méis são considerados baixos em relação a outros componentes presentes nos méis, porém a ingestão das vitaminas e minerais neles presentes estão associadas a diversas funções orgânicas, além de contribuírem para estabilidade físico-química do mel e estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Composição média de minerais e vitaminas no mel de abelhas *Apis mellifera*.

<b>Minerais</b>	<b>Teor mg.100 g<sup>-1</sup></b>	<b>Vitaminas</b>	<b>Teor mg.100 g<sup>-1</sup></b>
<b>Cálcio</b>	6	<b>Ácido ascórbico</b>	0,5
<b>Cobre</b>	0,036	<b>Ácido pant.</b>	0,068
<b>Ferro</b>	0,42	<b>Niacina</b>	0,121
<b>Fósforo</b>	4	<b>Piridina</b>	0,024
<b>Magnésio</b>	2	<b>Riboflavina</b>	0,038
<b>Manganês</b>	0,080	<b>Folato total</b>	2
<b>Potássio</b>	52		
<b>Selênio</b>	0,8		
<b>Sódio</b>	4		
<b>Zinco</b>	0,22		

Fonte: USDA (United States Department of Agriculture) – adaptado de SILVA et al., (2006)

O teor de minerais (cinzas) no mel é reflexo do perfil e da quantidade de minerais presentes no solo que fazem parte da composição do néctar utilizado como substrato pelas abelhas (ARAÚJO et al., 2006). Os minerais presentes no mel, tal qual suas concentrações podem indicar a origem botânica do produto (ALQARNI et al., 2012). Diferentemente de outros componentes do mel, os minerais não são degradáveis, permanecem estáveis a diversos fatores que degradam diversas substâncias nele presentes, como aquecimento excessivo, pH extremos, luz, agentes oxidantes, entre outros (DAMODARAM et al., 2010).

A legislação fixa o máximo em 0,6 g.100 g<sup>-1</sup> (0,6% da composição), segundo Brasil (2000). Amostras que apresentam teor de cinzas acima do máximo preconizado podem indicar adulteração do mel ou falta de higiene na extração ou beneficiamento, uma vez que existe a possibilidade de contaminação com resíduos inorgânicos (CARDOSO FILHO et al., 2012).

O mel possui em sua composição, vários minerais, os quais são elementos necessários ao organismo (diversos processos metabólicos são dependentes de minerais), com destaque para potássio e magnésio, onde existe uma alta correlação entre esses dois elementos, segundo United States Department of Agriculture (USDA, 2006). É possível encontrar no mel outros minerais, como sódio, cálcio, fósforo, ferro,



manganês, cobalto e cobre, e em função da presença e concentração de minerais, pode ser considerado um repositório eletrolítico no organismo humano (SILVA et al., 2006).

O mel não é considerado rico em vitaminas, contendo apenas traços desses nutrientes, em resumo, principalmente as vitaminas A, B2, C e B6 (SILVA et al., 2006). Apesar de baixo, o teor de vitaminas no mel é preservado graças ao pH ácido (BONTÉ, DESMOULIÈRE, 2013). Porém há uma degradação significativa do conteúdo vitamínico do mel no processo de filtração, pela retirada do pólen, além de oxidação das mesmas durante todo o processo de beneficiamento. A vitamina C além de sofrer oxidação com o aumento da aeração do mel, é sensível ao peróxido de hidrogênio, produzido por enzimas presentes no mel, e também a ação da glicose-oxidase, outra enzima presente no mel (CIULU et al., 2011). Trata-se da neutralização dos radicais livres produzidos pelas enzimas, com função antimicrobiana no mel pela vitamina C, característica funcional da vitamina.

Alguns parâmetros apresentam variabilidade bastante acentuada dependendo da florada, época e região de produção. A cor varia muito, podendo ir do amarelo esmaecido a pardo-escuro, assim como o sabor pode ser característico da florada de origem (SILVA et al., 2004; WIESE, 1986). Ou seja, esses fatores são preponderantes nos caracteres organolépticos do produto e presença/teor de compostos que estão relacionados às atividades terapêuticas do mel.

Outros fatores, como processamento e armazenamento também estão relacionados a cor do mel, uma vez que no armazenamento (a composição físico-química, e condições de armazenamento) existe a tendência de escurecimento, paralelamente com a mudança de outras características organolépticas (AUBERT e GONNET, 1983). A cor, juntamente com sabor e aroma estão relacionados a composição oriunda das floradas, e muitos acreditam que a relação entre cor e sabor seja de que quanto mais escuro é o mel, mais será seu sabor, ao passo que méis mais claro estão associados a sabores mais suaves (WOOTTON et al., 1976; GONZALES et al., 1999; MORETI et al., 2006).

Para Crane (1983), méis mais claros possuem maior aceitação no mercado global, e em função disso, maior valor agregado ao produto. Méis cristalizados tendem a parecer mais claros em função do esmaecimento favorecido pela rede cristalina formada. É possível classificar o mel de acordo com sua coloração através de uma escala, denominada Pfund, de acordo com absorvância média em espectrofotometria na região do visível.

Para Lacerda et al (2010) méis com coloração mais escura possuem maior teor de compostos fenólicos, cujo papel na saúde humana é muito importante uma vez que tais compostos apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana.

#### 2.4.4 – Propriedades funcionais - Atividade antioxidante do mel

Alimentos funcionais são aqueles que além de nutritivos, possuem moléculas com efeitos bioativos que atuam benéficamente em uma ou mais funções no organismo, de forma que atuam tanto na manutenção do estado de saúde e bem-estar, como na prevenção de doenças (ROBERFROID, 2002; MORAES, COLLA, 2006).

O papel dos antioxidantes na saúde está no sequestro e neutralização de radicais livres produzidos no organismo quando há um desequilíbrio na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN, respectivamente), por diversos motivos, desde pré-disposição genética, até exposição a fatores que favoreçam reações oxidativas (tabagismo, alcoolismo, estresse, má alimentação, compostos químicos), que agem de maneira danosa no organismo, associadas a inúmeras patologias, alguns tipos de câncer, problemas cardíacos, neurológicos, envelhecimento precoce dentre outros (LÓPEZ-ALARCÓN e DENICOLA, 2013).

De acordo com Jones (2006), um bom antioxidante é o composto capaz que de neutralizar as espécies reativas radicalares e também atua como estimulante da expressão gênica de enzimas endógenas antioxidantes, como por exemplo a catalase, superóxido-dismutase, glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, entre outras. A presença destes compostos no mel de abelhas depende não somente do tipo da florada de origem, como também de fatores edafoclimáticos que interferem diretamente na produção desse tipo de substância, que é proveniente do metabolismo secundário das plantas. Assim, a presença de antioxidantes enzimáticos como a glucose oxidase (secretada pelas abelhas) e os não enzimáticos como derivados de carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides e vitaminas dependem do substrato utilizado pelas abelhas (SMCHRAM et al., 2003).

As vitaminas, além de desempenharem papel importante no metabolismo, agem como antioxidantes. O ácido ascórbico neutraliza compostos radicalares, doando elétrons a essas espécies reativas neutralizando-as, impedindo assim que iniciem reações em cadeia de peroxidação lipídica, protegendo os tecidos. Essa vitamina também possui a capacidade de regenerar outros antioxidantes, ativando-os para que possam exercer seu papel, como a vitamina E, o  $\beta$ -caroteno, flavonoides, o complexo enzimático glutaciona, havendo ainda, evidências de sua ação na integridade do tecido vascular, tônus muscular, no metabolismo lipídico e na regulação da pressão arterial (BATLOUNI, 1997; RIQUE et al., 2002; BONI et al., 2010).

Os compostos fenólicos presentes no mel (ácidos fenólicos e flavonoides) são excelentes captadores de radicais peroxil, produzidos nas células, são capazes ainda

de quelar íons férricos, que catalisam reações de peroxidação de lipídios componentes das células e possuem alta biodisponibilidade na porção aquosa do sangue, o plasma (SCHRAMM et al., 2003).

Em méis monoflorais (flor de laranjeira) e silvestres provenientes de cidades dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo foram identificados vários compostos fenólicos como: ácido gálico, ácido p-hidróxibenzóico, ácido p-cumárico, ácido protocatequínico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido cinâmico, ácido p-metóxicinâmico, ácido sinápico, isoquercetina, rutina, morina, quercetina em diferentes concentrações dependendo da origem floral. O que mostra a riqueza de componentes do mel de abelhas e o potencial para melhorar a saúde, prevenindo e tratando diversas doenças, sendo que os silvestres apresentaram potencial antioxidante (nos ensaios com radical livre estável DPPH e através de FRAP) superior aos monoflorais. (LIANDA et al., 2012).

#### 2.4.5 – Atividade antimicrobiana do mel

Segundo levantamento de Silva et al (2006), as propriedades terapêuticas do mel são reconhecidas desde a antiguidade, e sua utilização sempre esteve associada a inúmeras formas de tratamento de várias condições clínicas. Trata-se de um eficiente repositor de glicose na reidratação, auxiliando a absorção de água e sódio, em casos de diarreias e gastroenterites em adultos e crianças. Há também evidências de sua ação antiinflamatória e reparadora de tecidos, no trato digestivo, respiratório, oral e ocular, com ações antibacterianas e antifúngicas reconhecidas por diversos estudos científicos.

Na última década cresceu a preocupação com a resistência bacteriana frente aos antibióticos, uma vez que o uso indiscriminado e irracional promove a seleção de cepas resistentes, e em alguns casos tornando escasso as opções de tratamento para determinadas infecções (GUIMARÃES et al., 2010). Diversos fatores intrínsecos do mel estão associados à sua atividade antimicrobiana e vários microrganismos são sensíveis a méis, portanto trata-se de uma alternativa natural aos antibióticos comumente utilizados, os quais apresentam um risco aumentado de estimularem resistência pelo uso indiscriminado e irracional.

O uso do mel, em detrimento ao uso do açúcar comum (alto valor calórico e baixo valor nutritivo), é bastante recomendável quando leva-se em conta não somente o teor calórico, como também os benefícios nutritivos do alimento, tanto as funcionais e também terapêuticas. De acordo com levantamento realizado por SILVA et al. (2006), os méis de abelhas africanizadas têm sido recomendados para diabéticos, para distúrbios gastrointestinais como gastrite causada por *Helicobacter pylori*, úlceras,

como prebiótico intestinal, para feridas e afecções na pele dentre outras aplicações terapêuticas.

A atividade antimicrobiana do mel está relacionada a várias qualidades do alimento. Sua baixa atividade de água, aliada a alta pressão osmótica, pH baixo, alta viscosidade, baixo conteúdo proteico, atividade enzimática e presença de minerais que gera espécies radicalares capazes de atacar a membrana celular de microrganismos, além de compostos com caráter antimicrobiano são responsáveis por essa característica no mel (TAORMINA et al., 2001; SILVA et al., 2006). Para Molan (1999), o mel sendo uma solução supersaturada de açúcares que condiciona uma baixa atividade de água, com caráter ácido, o torna um ambiente desfavorável para inúmeros patógenos.

Algumas substâncias presentes no mel, embora em pequenas quantidades também apresentam atividade antimicrobiana, sendo elas: pinocebrina, terpenos, álcool benzol, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzeno; metil-3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato; ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico; ácido 2-hidroxi-3-penilpropriônico; ácido 2-hidroxibenzoico e 1,4-dihidroxibenzeno (SILVA et al., 2006).

Segundo Miraglio (2003), inúmeras cepas bacterianas apresentaram sensibilidade a testes com méis, sendo elas: *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pasteurella multocida*, *Proteus species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella species*, *Salmonella cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella species*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholerae*.

Para Silva et al. (2006), a utilização do mel configura um nicho para a prevenção e tratamento das doenças causadas por microrganismos, e também seu uso enquanto adjuvante tecnológico na indústria alimentícia na substituição ou associação de substâncias cuja finalidade é proteger o alimento de patógenos que podem contaminar o mesmo.

2.4.6. – Microrganismos patogênicos causadores de doenças veiculadas por alimentos

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva esférica, que ocorre em conglomerados que se assemelham a cachos de uva, patógeno associado a diversas doenças, desde infecções sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, oportunistas, e intoxicação alimentar, devido a sua alta virulência (LOWY, 1998). Existe

uma crescente preocupação com as linhagens que já apresentam resistência a meticilina, droga de escolha para o tratamento de algumas doenças causadas pela bactéria em âmbito hospitalar (BAZONI, 2012). O estudo de Miraglio (2003) apontou a suscetibilidade de algumas cepas de *S. aureus* frente a méis, o que torna uma alternativa de tratamento ou prevenção de infecções causadas por esse agente.

*Escherichia coli*, é a mais representativa espécie dentre o grupo de bactérias comumente designadas coliformes fecais, está relacionada a infecções no trato urogenital (70% a 90%) e também 50% das infecções hospitalares (KORB et al., 2013). A infecção por *E. coli* também é considerada uma doença veiculada por alimentos uma vez que em função da falta de higiene na manipulação de alimentos por parte da pessoa que manipula diretamente o produto.

As salmonelas (*Salmonella spp.*) pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo que, morfológicamente, são bastonetes Gram negativos. As espécies pertencentes a este gênero estão associadas a doenças veiculadas por alimentos, infecções causadas em grande parte por serviços que manipulam alimentos, configurando problemas na higiene na manipulação, sendo um problema de saúde pública (PINTO et al., 2004).

A utilização do mel frente a cepas sensíveis é uma alternativa interessante para indústria de alimentos, uma vez que as cepas bacterianas do presente estudo estão relacionadas a doenças veiculadas por alimentos, havendo a possibilidade de ser utilizado como um conservante natural além de agregar outros compostos de interesse para saúde aos produtos acrescidos de mel, com essa finalidade.

### 3. Objetivos

#### 3.1 – Objetivo geral

Avaliar méis produzidos no estado de Mato Grosso do Sul, quanto a caracterização físico-química, compostos bioativos e atividade antimicrobiana.

#### 3.2 – Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros físicos e químicos nos méis e comparar com os exigidos pela Instrução Normativa número 11 de 20 de outubro de 2000 que dispõe a respeito do regulamento técnico de Identidade e Qualidade do mel de abelhas de *Apis mellifera*.

- Determinar a cor dos méis do estudo, e classifica-los de acordo com a coloração apresentada.

- Determinar os tipos polínicos presente nas amostras, e classifica-los de acordo com seu conteúdo de pólen.

- Quantificar a capacidade inibitória em 50% do radical livre DPPH em extratos aquosos acidificados, assim como os teores de compostos fenólicos solúveis em água e taninos presentes nos diferentes méis analisados.

- Avaliar a atividade antimicrobiana das amostras de mel frente a três microrganismos associados a doenças veiculadas por alimentos sendo elas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* Além da quantificação das concentrações mínimas inibitórias (CIM) e concentrações mínimas (CBM) bactericidas das amostras frente as cepas bacterianas deste estudo.

#### 4. Metodologia

##### 4.1 – Material

No entreposto Vovô Pedro, em Campo Grande/MS foram obtidos os tipos monoflorais (informação da florada predominante no rótulo) de cipó-uva (Figura 1), aroeira (Figura 2) e mel silvestre (Figura 3), recebidas em novembro de 2015, e na AgroHB mel silvestre (Figura 4) beneficiado em Bodoquena/MS, recebidas em março de 2016, com três amostras de cada tipo de mel, pertencentes a um mesmo lote cada, que foram encaminhadas para a Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (UTASP/CCBS) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

As amostras foram recebidas em embalagens plásticas de polietileno rotuladas (com exceção das amostras de mel silvestre de Bodoquena) e prontas para comercialização, onde foram todas acondicionadas em caixa de isopor higienizada, mantidas nas embalagens originais, e armazenadas em sala com temperatura climatizada em torno de 20°C, sem fonte de luz direta até o momento das análises.



**Figura 1** – Amostras de méis monofloral de Cipó-uva, cedidas pelo apiário Vovô Pedro (Campo Grande – MS). No estudo cada amostra foi nomeada CP1, CP2 e CP3.



**Figura 2** – Amostras de méis monofloral de Areira, cedidas pelo apiário Vovô Pedro (Campo Grande – MS). No estudo cada amostra foi nomeada A1, A2 e A3.



**Figura 3** – Amostras de méis Silvestres, cedidas pelo apiário Vovô Pedro (Campo Grande – MS). No estudo cada amostra foi nomeada SCG1, SCG2 e SCG3.





**Figura 4** – Amostras de méis silvestres, cedidas pela Agro HB (Bodoquena – MS). No estudo cada amostra foi nomeada SBDQ1, SBDQ2 e SBDQ3.

#### 4.2 – Análises físico-químicas

##### 4.2.1 – Umidade

Determinou-se os teores de umidade e de sólidos solúveis do mel foram obtidos por meio do refratômetro de Abbé marca PZO RL3 com temperatura corrigido para 20°C na tabela de Chataway. O conteúdo de umidade correspondente foi obtido através da tabela 969.38 da AOAC (1997), a qual relaciona o índice de refração com o conteúdo de água, sendo expresso em porcentagem.

##### 4.2.2 – Cinzas (minerais)

Foi determinado por gravimetria após a calcinação da amostra em mufla marca FANEM modelo 42 à temperatura de 650°C, de acordo com o método 920.181 (AOAC, 1997).

#### 4.2.3 – Glicídios redutores, em glicose

Os glicídios redutores em glicose foram determinados pelo método de Lane-Eynon, utilizando o reativo de Fehling padronizado, conforme técnica 4.13.2 do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005).

#### 4.2.4 – Glicídios não-redutores, em sacarose

Os teores de glicídios não redutores, em sacarose foram determinados após hidrólise ácida da amostra em meio aquoso, e em seguida utilizando o reativo de Fehling para titulação, por meio da técnica 4.13.3 do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005).

#### 4.2.5 – Determinação de valor de pH

Pesou-se 10 gramas de amostra de mel diluídos em 75 mL de água destilada isenta de CO<sub>2</sub>, e a leitura feita em potenciômetro marca Analyser. O procedimento analítico adotado encontra-se descrito no método 962.19 (AOAC, 1997).

#### 4.2.6 – Teor de acidez

Este método baseia-se na determinação da acidez obtida da titulação com hidróxido de sódio até o ponto de equivalência. Pesou-se 10 g da amostra em um béquer de 250 mL, foi adicionado 75 mL de água destilada neutralizada, onde se inseriu, com agitação constante, o eletrodo do potenciômetro da marca Analyser na solução e foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,05 N até que se alcançou o pH 8,5. Essa metodologia está descrita em 964.19 (AOAC, 1995).

#### 4.2.7 – Teor de Hidroximetilfurfural (HMF)

Trata-se de um método quantitativo baseado na determinação de 5-hidroxi-metilfurano-2-carbaldeído (HMF), utilizando-se espectrofotometria na região do UV (284 e 336nm). Conforme 980.23 (AOAC, 1995).

#### 4.2.8 – Sólidos insolúveis em água

É possível determinar o teor de sólidos insolúveis em água presentes no mel, através de método gravimétrico, cuja metodologia está descrita pela (CAC 1990).

#### 4.2.9 – Métodos de detecção de fraudes: reações de Lund e Lugol

São metodologias descritas por Brasil (1978), sendo Lund a detecção de compostos naturais em méis florais e lugol a detecção de amidos ou dextrinas adicionadas fraudulentamente ao mel.

#### 4.2.10 – Atividade da enzima diastásica (método qualitativo)

Foi verificada a atividade diastásica do mel, pelo método qualitativo, com diluição das amostras, adição de solução de amido com posterior aquecimento, após o período necessário para reação será adicionado lugol, que acusa a presença do amido caso a enzima não esteja funcional (LANARA, 1981).

#### 4.2.11 – Análise de cor

Para a determinação da cor das amostras, utilizou-se o método proposto por Bianchi (1981), adaptado. Cada amostra foi diluída em água ultrapura (água Milli-Q®), obtendo-se uma solução a 50% (m/v), e após a diluição, aguardou-se 15 minutos para a realização da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 635 nm, utilizando-se água ultrapura como branco. Cada amostra foi analisada em triplicata e as leituras obtidas foram classificadas de acordo com a escala de Pfund, conforme Tabela 3.

**Tabela 3** – Classificação da coloração do mel de acordo com escala de Pfund.

Coloração	Faixa de coloração (*)	Escala de Pfund (mm)
<b>Branco d'água</b>	Até 0,030	1 a 8
<b>Extra branco</b>	de 0,030 até 0,060	9 a 17
<b>Branco</b>	de 0,061 até 0,120	18 a 34
<b>Extra âmbar claro</b>	de 0,121 até 0,188	35 a 50
<b>Âmbar claro</b>	de 0,189 até 0,440	51 a 85
<b>Âmbar</b>	de 0,441 até 0,945	86 a 114
<b>Âmbar escuro</b>	acima de 0,945	acima de 114

(\*) Leitura obtida através de espectrofotometria, após preparação adequada do mel. (CAMARGO et al., 2006) adaptada.

#### 4.3 – Análise melissopalínológica

Para classificação das amostras e determinação das origens polínicas, utilizou-se uma adaptação do método proposto por Jones e Bryant Jr. (2004), onde as amostras passaram por tratamento acetolítico e sucessivas centrifugações para obtenção de precipitado concentrado de pólen, que posteriormente foram fixadas em lâminas de vidro, para identificação botânica dos grãos de pólen presentes nas amostras.

#### 4.4 – Compostos bioativos

##### 4.4.1 – Preparo das amostras para atividade antioxidante, fenóis totais e taninos

Para o preparo dos extratos aquosos acidificados pesou-se em torno de três gramas de cada amostra com diluição em água acidificada em pH 2,0, (LIANDA et al., 2012) e transferência para balão volumétrico de 50 mL. A partir desses extratos, foram realizadas as análises de compostos bioativos fenóis totais e taninos e da atividade antioxidante pelo método com utilização de DPPH, em triplicata para cada amostra.

##### 4.4.2 – Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante em sequestrar radicais livres foi avaliada utilizando o método fotocolorimétrico do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazila) (ALI et al., 2009; MELO et al., 2006). O método se baseia no sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) pelos antioxidantes, e leitura em espectrofotômetro com incidência de feixe de luz visível no comprimento de onda de 517 nm. A partir dos extratos aquosos acidificados foram preparados com 1800  $\mu\text{L}$  de DPPH (0,004% m.v<sup>-1</sup>) e o volume final foi ajustado para 2000  $\mu\text{L}$ . A capacidade de sequestrar radical livre é expressa a partir do percentual de inibição de oxidação do radical livre DPPH.

##### 4.4.3 – Quantificação de fenóis totais

A quantificação dos fenóis totais foi realizada pelo método *Folin-Ciocalteu* (SWAIN e HILLS, 1959), o qual envolve a redução do reagente por compostos fenólicos da amostra com a formação de um complexo azul detectados no comprimento de onda de 760 nm (espectro visível). Para leitura das amostras foram pipetados 0,5mL do extrato aquoso acidificado e adicionados 2,5 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu* e 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Foi construída uma curva padrão com ácido gálico nas concentrações de 0,025; 0,075; 0,09; e 0,105 mg.mL<sup>-1</sup>. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 760 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico em 100 g de amostra (mg EAG.100 g<sup>-1</sup>).

##### 4.4.4 – Quantificação de taninos

O teor de taninos foi determinado por espectroscopia no comprimento de onda de 760 nm por meio do reagente Folin-Denis (IAL, 2005), adaptado para menor consumo de reagentes. Foi construída a curva de calibração a partir das concentrações de 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 mg mL<sup>-1</sup> de ácido tânico com adição aos tubos de ensaio água destilada, 0,5 mL de Folin-Denis e 1 mL de solução aquosa saturada de carbonato de sódio a 35%.

Para o cálculo do teor na amostra, 0,25 mL de extrato aquoso acidificado foi pipetado juntamente com 4,0 mL de água destilada, 0,25 mL de Folin-Denis e 0,5 mL de carbonato de sódio 35%, com base nas absorvâncias obtidas foi possível calcular os teores de taninos e resultados foram expressos em mg de equivalentes ácido tânico em 100 g de amostra (mg EAT.100 g<sup>-1</sup>).

#### 4.4.5 – Quantificação de ácido ascórbico (vitamina C)

Foi obtido o teor de ácido ascórbico presente no mel através de titulometria por meio do reagente 2,6-diclorofenolindofenol sódico a 0,2%, com utilização de padrão de ácido ascórbico cuja concentração conhecida é comparada à obtida na titulação das amostras puras diluídas em solução aquosa de ácido oxálico a 1% (AOAC,1995). Cada amostra de mel foi analisada em duplicata, e os resultados, após cálculo de concentração foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra de mel (mg. 100 g<sup>-1</sup>).

#### 4.5 – Atividade antimicrobiana

Para verificação da atividade antibacteriana dos méis deste estudo, foi necessário preparar o mel artificial, sendo controle negativo nas análises, preparado de acordo com Khosravi et al. (2008), com a utilização de açúcares perfazendo 80% (m/v).

O antibiótico, controle positivo, foi preparado na concentração de 300 µg.mL<sup>-1</sup>, com água ultrapura (água Milli-Q®), do fármaco azitromicina. Azitromicina (Azt) é uma substância de ação antimicrobiana, da classe dos macrolídeos, com ação bactericida e bacteriostática (inibindo a síntese proteica em cepas bacterianas sensíveis), cujo espectro de ação é amplo, apresentando ação antimicrobiana, ao menos *in vitro*, para as cepas utilizadas no estudo.

##### 4.5.1 – Teste de inibição do crescimento bacteriano pela difusão em ágar

Preparou-se inóculo bacteriano das cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella spp da American Type Culture Collection* (ATCC), cedidas pelo Instituto Fiocruz/RJ, de acordo com metodologia proposta pela Clinical and Laboratory Standards Institute (2003). Selecionou-se de 2 a 3 colônias das três cepas isoladas em ágar Muller-Hinton (HIMEDIA) e em seguida diluídas em tubos de ensaio contendo solução salina a 0,85%, onde obteve-se a turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland (Probac®), correspondente a cerca de 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, que foram semeadas em placas MH, e em seguida foram confeccionados, com furador metálico autoclavado, poços de 4 mm de diâmetro, para inserção de 50 µL das amostras dos méis puros em triplicata, 50 µL

de azitromicina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e  $50 \mu\text{L}$  de mel artificial puro (controle negativo). Com incubação a  $37^\circ\text{C}$  pelo período de 24h, e posterior medição dos halos de inibição de crescimento bacteriano em mm, com utilização de paquímetro (Western PRO®).

#### 4.5.2 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Foi utilizada a técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços, com fundo em 'U', de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (2006), com adaptações. Para determinação da concentração mínima necessária para inibição do crescimento bacteriano, aos poços foram adicionados  $100 \mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton, MH (HIMEDIA), com inoculação de cada cepa bacteriana utilizada para cada amostra separadamente, no volume de  $10 \mu\text{L}$  (preparação descrita no item 4.5.1), adição das amostras de mel e mel artificial, ambos diluídos em água ultrapura,  $50 \mu\text{L}$ , na concentração de  $500 \text{mg mL}^{-1}$ , cada amostra em duplicata onde procedeu-se a diluição seriada de 1:1 até 1:512. Para o controle negativo, utilizou-se azitromicina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), nas mesmas condições das amostras ( $50 \mu\text{L}$  em diluições seriadas 1:1 até 1:512), em diferentes fileiras de poços contendo o inóculo bacteriano para todas as cepas, e ainda foram utilizadas duas fileiras de poços contendo apenas o caldo MH para fins comparativos, com posterior incubação a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 24h e leitura com revelador resazurina (Inlab®),  $30 \mu\text{L}$  na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , preparada também com água ultrapura, que indica atividade bacteriana pela cor, e após 2h a coloração azul, é indício de ausência de atividade bacteriana e rósea para presença de compostos bioquímicos que indicam metabolismo bacteriano (PALOMINO, et al., 2002).

Para determinação da concentração bactericida mínima, foi inoculado  $10 \mu\text{L}$  da menor concentração inibitória (CIM) encontrada, e do poço imediatamente anterior em ágar Mueller-Hinton (MH), onde a CBM foi considerada quando não houve crescimento bacteriano após incubação em estufa bacteriológica a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 4.6 – Análise estatística

A estatística foi obtida a partir dos dados quantitativos resultantes das análises, em triplicata para cada amostra, apresentada em média aritmética e desvio-padrão, com análise de variância (ANOVA de uma via) e pós-teste de Tukey-Kramer, onde foi considerada diferença estatística  $p < 0,05$ . Os testes estatísticos foram realizados através do software GraphPad InStat versão demo.

## 5. Resultado e Discussão

### 5.1 – Análises físico-químicas.

Os parâmetros físico-químicos nos méis seguiram as diretrizes da Instrução Normativa n. 11 de 20 de outubro de 2000, regulamento técnico de qualidade e identidade do mel de *Apis mellifera* (BRASIL, 2000) prova de Lund e Lugol (BRASIL, 1978) e atividade diastásica (LANARA, 1981).

**Tabela 4** – Parâmetros físico-químicos das amostras de mel de *Apis mellifera* coletados produzidos em Mato Grosso do Sul, expressos em média e desvio padrão.

Parâmetros	Cipó-Uva	Aroeira	Silvestre CG	Silvestre BDQ
Umidade (%)	16,39 ± 0,015 <sup>a</sup>	17,25 ± 0,05 <sup>b**</sup>	17,27 ± 0,011 <sup>b**</sup>	17,94 ± 0,011 <sup>c</sup>
Cinzas (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,049 ± 0,031 <sup>d</sup>	0,144 ± 0,025 <sup>c</sup>	0,28 ± 0,065 <sup>b</sup>	0,351 ± 0,034 <sup>a</sup>
pH	4,21 ± 0,015 <sup>c</sup>	3,84 ± 0,026 <sup>b</sup>	4,46 ± 0,023 <sup>d</sup>	3,44 ± 0,03 <sup>a</sup>
Acidez Titulável (mEq.kg <sup>-1</sup> )	41,85 ± 0,47 <sup>c**</sup>	43,92 ± 0,67 <sup>b</sup>	40,10 ± 0,24 <sup>c**</sup>	47,94 ± 1,07 <sup>a</sup>
HMF (mg.Kg <sup>-1</sup> )	19,39 ± 0,99 <sup>b**</sup>	18,46 ± 2,29 <sup>b**</sup>	26,97 ± 3,09 <sup>a</sup>	10,10 ± 0,62 <sup>c</sup>
Sacarose Aparente (g.100 g <sup>-1</sup> )	5,80 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,47 ± 0,06 <sup>c</sup>	5,87 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,37 ± 0,15 <sup>b</sup>
Açúcares Redutores (g.100 g <sup>-1</sup> )	73,7 ± 0,22 <sup>a</sup>	66,9 ± 0,46 <sup>c</sup>	68,29 ± 0,08 <sup>b**</sup>	68,08 ± 0,68 <sup>b**</sup>
Sólidos Insolúveis (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,042 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,015 ± 0,005 <sup>c**</sup>	0,012 ± 0,001 <sup>c**</sup>	0,027 ± 0,001 <sup>b</sup>
Lund (mL)	2,23 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,53 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,75 ± 0,15 <sup>b</sup>
Lugol*	-	-	-	-
Atividade diastásica	+	+	+	+

\*Teste qualitativo, (-) e (+) \*\* Letras iguais não diferiram estatisticamente na linha ( $p > 0,05$ ), resultados expressos em média e desvio-padrão.

Os valores de umidade encontrados nas amostras foram entre 16,39 e 17,94%, todos abaixo do limite máximo fixado pela legislação brasileira de 20% (BRASIL, 2000). O menor teor de umidade foi apresentado pelas amostras de mel de cipó-uva (16,39%), seguido pelas amostras de mel de aroeira, mel silvestre Campo Grande e as amostras de mel silvestre de Bodoquena com 17,94%, superior estatisticamente. Cardoso Filho et al. (2012), encontraram em dez amostras de méis comercializadas no Mercado Municipal Antônio Valente em Campo Grande-MS, sem fiscalização de produção e

venda, teores abaixo dos obtidos no presente estudo, entre 9,85 e 14,25%. No entanto, outros estudos de amostras de méis provenientes do estado de Mato Grosso do Sul observaram valores compreendidos entre 15,96 a 22,51% de umidade (CARDOSO FILHO et al., 2011); e de 15,7 a 26% de umidade em méis de Cassilândia (VIEIRA, 2005).

Mendonça et al. (2008) obteve teores de umidade que variaram entre 15,6 a 19,5% em amostras de méis produzidos em uma região de Cerrado no interior do estado de São Paulo. Trata-se de um parâmetro de qualidade muito importante para o mel, pois amostras que apresentam teores acima de 20%, possuem uma menor estabilidade físico-química e microbiológica.

O conteúdo de resíduo mineral fixo, também denominado cinzas, variou nos diferentes méis entre 0,049 e 0,351 g.100 g<sup>-1</sup>, diferindo estatisticamente entre si. A totalidade das amostras foi inferior ao limite máximo fixado pela Instrução Normativa, de 0,6 g.100 g<sup>-1</sup> de produto (0,6%) (BRASIL, 2000). Quantidades acima do limite máximo podem indicar contaminação com sujidades inorgânicas como areia ou terra durante a colheita e/ou processamento, sendo em grande parte o resultado representado pelo teor de minerais presentes no mel.

Os menores teores foram apresentados pelos méis de cipó-uva e aroeira com 0,049 e 0,144 g.100 g<sup>-1</sup>, ambos produzidos no município de Campo Grande – MS. Alves et al. (2011) encontraram teores semelhantes para amostras de cipó-uva (0,045%) e superiores em mel de aroeira (0,26%), produzidos no Ceará.

Os méis silvestres apresentaram maiores teores de cinza, perfazendo 0,28 e 0,351 g.100 g<sup>-1</sup> nas amostras dos méis Campo Grande e de Bodoquena, respectivamente. Vieira (2005) observou valores compreendidos entre 0,10 e 0,68 g.100 g<sup>-1</sup> em amostras de méis produzidas em Cassilândia, município de Mato Grosso do Sul. Bera (2004) obteve valor médio de 0,20 g.100 g<sup>-1</sup> em amostras de méis, as quais não sofreram alteração dos teores após adição de própolis.

Acidez titulável é um parâmetro físico-químico muito importante e nas amostras analisadas ocorreram dentro do limite máximo estipulado pela legislação de 50 mEq.Kg<sup>-1</sup>, sendo o mel silvestre Campo Grande e de cipó-uva inferiores estatisticamente (40,10 e 41,85 mEq.Kg<sup>-1</sup>), e os méis de aroeira e silvestre Bodoquena diferiram estatisticamente entre si, com valores de 43,92 e 47,94 mEq.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. A acidez é uma característica do mel influenciada em sua formação pela florada de origem e localidade, pelo manejo na colheita, pelo beneficiamento e armazenamento do produto. Teores de acidez acima do máximo preconizado tendem a ser menos estáveis na composição físico-química e pode ser indicativo de uma qualidade microbiológica questionável (TERRAB et al., 2004).



Valores médios de acidez titulável semelhantes foram obtidos por Abadio Finco et al (2010) em amostras de méis de floradas diversas, 44,7 mEq.Kg<sup>-1</sup>. Grande variações nos valores de acidez em amostras de diversas floradas foram relatadas, entre 29,33 e 47,67 mEq.Kg<sup>-1</sup> (Marchini et al., 2004); entre 31,3 e 75,1 mEq.Kg<sup>-1</sup>, em amostras de méis comercializados no Mercado Municipal Antônio Valente em Campo Grande – MS, muitas delas em não-conformidade com a legislação em virtude da falta de fiscalização na produção e comercialização desses produtos (CARDOSO FILHO, 2012).

Os valores de pH diferiram estatisticamente entre os méis analisados, os quais foram de 3,44 para o mel silvestre de Bodoquena, de 3,84 para o mel de aroeira, 4,21 para o mel de cipó-uva e com maior valor de pH o mel silvestre de Campo Grande 4,46 o qual correspondeu ao menor teor de acidez titulável dentre as amostras. A análise de pH não é exigida pela legislação para méis, porém constitui um parâmetro importante quanto à qualidade do mel, e compreende a faixa de pH de 3,3 a 4,6. Valores de pH abaixo de 4,0 configuram um ambiente insalubre para o desenvolvimento microbiológico (SILVA et al., 2004).

Marchini et al. (2004) encontraram valores de pH semelhantes foram relatados com méis de floradas diversas e de diferentes regiões, variando de 3,21 a 4,31 em amostras no Tocantins e entre 3,27 e 4,45 em uma região de fragmento de Cerrado, no estado de São Paulo (ALMEIDA-ANACLETO e MARCHINI, 2004). Em diferentes cidades do estado de São Paulo, valores de pH 3,6 a 3,2 foram encontrados para méis de eucalipto e silvestres, respectivamente (MARCHINI, 2001).

Todas as amostras apresentaram teores de açúcares redutores (em glicose) acima do mínimo exigido pela legislação brasileira de 65 g.100 g<sup>-1</sup>, que variaram entre 66,9 g.100 g<sup>-1</sup> nas amostras de mel de flor de aroeira ao valor mais elevado estatisticamente com 73,7 g.100 g<sup>-1</sup> nos méis monoflorais de cipó-uva. Alves et al. (2011) obtiveram valores próximos em amostras de mel de cipó-uva, 72,98 g.100 g<sup>-1</sup> produzidos na região do Cariri, no Ceará, e valores superiores em aroeira, 71,26 g.100 g<sup>-1</sup>. O que ressalta a interferência das condições geográficas e climáticas, além da origem botânica.

Os méis silvestres apresentaram valores que não diferiram entre si, mesmo sendo méis produzidos em diferentes localidades em Mato Grosso do Sul, cuja origem multifloral é distinta. Um estudo com méis produzidos em diferentes cidades do estado de São Paulo obteve valores médios para méis silvestres de 72,6 g.100 g<sup>-1</sup>, superior ao observado nas amostras produzidas em Mato Grosso do Sul, porém teores inferiores aos obtidos de méis monoflorais de laranjeira, com média de 74,6 g.100 g<sup>-1</sup>, demonstrando a diversidade na composição em função da localidade, origem floral e época do ano (KOMATSU et al., 2002).

Os maiores teores de sacarose aparente foram de 5,80 e 5,87 g.100 g<sup>-1</sup> dos méis de Campo Grande cipó-uva e silvestre, respectivamente, beneficiados no apiário, que não diferiram estatisticamente entre si. Todos os méis foram considerados em conformidade ao valor máximo preconizado de 6 g.100 g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000). Em mel de cipó-uva teores próximos aos encontrados em amostras da mesma florada foram relatados por Alves et al. (2011).

Almeida-Anacleto e Marchini (2004) encontraram teores que variaram de 0,2 a 11,4 g.100 g<sup>-1</sup> de sacarose aparente em amostras de méis florais silvestres produzidos no município de Pirassununga-SP, Cerrado paulista, sendo que mais de 30% das amostras se encontravam acima do teor máximo permitido, possivelmente imaturidade do mel ou indicativo de fraude.

A quantificação do composto hidroximetilfurfural nas amostras foi de 10,09 a 26,97 mg.kg<sup>-1</sup>, dentro dos limites estabelecidos por lei de no máximo 60 mg por quilo do produto (BRASIL, 2000). A amostra que apresentou o menor teor de HMF foi o mel silvestre de Bodoquena, com valor médio de 10,09 mg.Kg<sup>-1</sup>, seguida pelas amostras de mel de aroeira e cipó-uva, com 18,46 e 19,38 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Não havendo diferença estatística entre as amostras de cipó-uva e aroeira. Alves et al., (2011) obtiveram os valores médios de 11,61 e 9,32 mg.Kg<sup>-1</sup>, em amostras de méis de aroeira e cipó-uva produzidas na região do Cariri no Ceará. Teores bastante satisfatórios considerando o clima do semiárido nordestino que tende a favorecer o aumento da substância no produto. Marchini (2001) encontrou valores médios de 19,3 mg.Kg<sup>-1</sup> em amostras de méis silvestres no estado de São Paulo.

Mato Grosso do Sul apresenta condições climáticas que também podem ser consideradas propícias para o aumento dos teores de HMF durante a estocagem, pois as temperaturas médias anuais estão em torno dos 30°C na maior parte do ano, principalmente na região onde os méis cedidos pelo apiário Campo Grande, no município de Campo Grande. Deve-se salientar que a florada também influencia na concentração de HMF nas amostras, por fornecer néctar que resultar em teores maiores ou menores desse composto.

Os valores médios obtidos para concentração de sólidos insolúveis em água variaram de 0,012 a 0,042 g .100 g<sup>-1</sup>, com menor valor nas amostras de mel silvestre Campo Grande e aroeira, os quais não diferiram estatisticamente entre si, e maior nas amostras de mel de cipó-uva. A totalidade das amostras ficaram abaixo do limite máximo fixado pela legislação vigente de 0,1 g.100 g<sup>-1</sup> (0,1%) (BRASIL, 2000). Bera (2004) obteve teores médios de sólidos insolúveis em méis de 0,017%, valores próximos aos obtidos no presente estudo. Alves et al. (2011), obtiveram valores médios para este parâmetro em méis de cipó-uva e aroeira de 0,19 e 0,27%, respectivamente, estando

acima do máximo permitido e portanto, em desacordo com a normativa. Trata-se de um parâmetro auxiliar para verificação de sujidades presentes no mel, ou falhas durante o processamento, detectando inclusive resíduos de cera (SANTOS e OLIVEIRA, 2013)

Para a prova de Lund, as amostras apresentaram sedimento que variou entre 1,53 e 2,23 mL, estando dentro da faixa recomendada, de 0,6 a 3,0 mL de sedimento (BRASIL, 1978). Esta faixa indica a presença de substâncias albuminoides oriundas de néctar de flores, o que demonstra presença de pólen, confirmando se tratar de méis florais, tal qual a denominação de venda do produto.

Para o teste do Lugol as amostras apresentaram resultado negativo, atestando assim não haver adulteração nos méis analisados e que de fato, se trata de mel de abelhas sem adição de amidos. Portanto, pode-se concluir que os méis deste estudo não sofreram tais tipos de fraudes, estando em conformidade com a legislação brasileira (BRASIL, 1978).

Todas as amostras apresentaram atividade da enzima diastásica, uma vez que após a adição do lugol não houve aparecimento da coloração arroxeadada, característica da reação do amido adicionado. Sendo assim, este foi consumido pela enzima, demonstrando sua atividade e descartando a possibilidade de superaquecimento durante o processamento, ou mesmo indicativo de uma amostra antiga (LANARA, 1981).

## 5.2 – Análise de cor e melissopalínológica

Após a leitura espectrofotométrica das amostras, para classificação de coloração, suas médias foram classificadas de acordo com a escala de Pfund, na Tabela 5.

**Tabela 5** – Coloração dos méis produzidos em Mato Grosso do Sul e classificação de acordo com escala de Pfund.

<b>Amostra</b>	<b>Média das leituras*</b>	<b>Coloração apresentada</b>
<b>Cipó-Uva</b>	0,126 ± 0,002	<i>Extra âmbar claro</i>
<b>Aroeira</b>	0,358 ± 0,005	<i>Âmbar claro</i>
<b>Silvestre Campo Grande</b>	0,354 ± 0,003	<i>Âmbar claro</i>
<b>Silvestre Bodoquena</b>	0,29 ± 0,007	<i>Âmbar claro</i>

\*Leitura no comprimento de onda de 635 nm, expressos em média das repetições e desvio-padrão.

O mel monofloral de cipó-uva apresentou a cor mais clara entre as amostras, sendo classificado como extra âmbar claro, e as demais amostras (aroeira e os



<i>Cecropia</i>	<1	+	3,69	Pli	6,28	Pli	<1	+
<i>pachystachya</i>								
<i>Mimosa</i>	<1	+	-	-	<1	+	<1	+
<i>verrucosa</i>								
<i>Poaceae</i>	<1	+	-	-	<1	+	<1	+
<i>Solanaceae</i>	<1	+	-	-	<1	+	<1	+
<i>Fabaceae</i>	-	-	3,69	Pli	-	-	-	-

CP = amostras de mel de cipó-uva; A = amostras de mel de aroeira; SCG = amostras de mel silvestre Campo Grande; SBDQ = amostras de mel silvestre Bodoquena; (-) = ausência da espécie na amostra; PD = pólen dominante (acima de 45%); PA = pólen acessório (16 a 45%); Pli = pólen isolado importante (3 a 15%); Plo = pólen isolado ocasional (<3%), (+) = pólen traço (abaixo de 1%) (LOUVEAUX et al., 1970).

As amostras declaradas como sendo de mel monofloral de cipó-uva, *Serjania sp.*, apresentaram apenas 14,38% dessa espécie, sendo considerado um pólen isolado importante (Pli), e 41,78% de *Schinus terebinthifolius*, a aroeira vermelha, como pólen acessório (PA), além de outras espécies florais presentes em menores quantidades. Portanto as amostras são, na realidade, multiflorais (silvestres).

No estudo com 30 amostras de mel monofloral produzidos na região Sudeste do Brasil, somente cerca de 57% eram realmente procedentes de uma única espécie vegetal, sendo que cinco eram biflorais (17%) e cerca de 27% (8 amostras) eram heteroflorais. Dentre estas amostras sete indicavam no rótulo serem de cipó-uva, mas todas possuíam outros pólenes em quantidades superiores, como de flores de laranjeira e de aroeira (BARTH et al., 2005). Em 17 amostras de mel, 41,20% foram classificadas como monofloral e o restante como polifloral (SEREIA et al., 2011).

Entretanto, os grãos de pólen de algumas flores podem estar superestimados em função de suas percentagens de pólen no sedimento é maior que a porcentagem do néctar correspondente no mel, em geral, apresentam conteúdo de pólen absoluto mais elevado que méis de fontes com pólenes normalmente (LOUVEAUX et al., 1970). Portanto, o mel indicado como cipó-uva seria na realidade de origem multifloral, silvestre, com predominância de aroeira e pólen isolado importante de cipó-uva, porém com características marcantes da presença de cipó-uva, *Serjania sp.*, na cor, classificado como Extra Âmbar Claro e caracteres organolépticos como sabor e aroma.

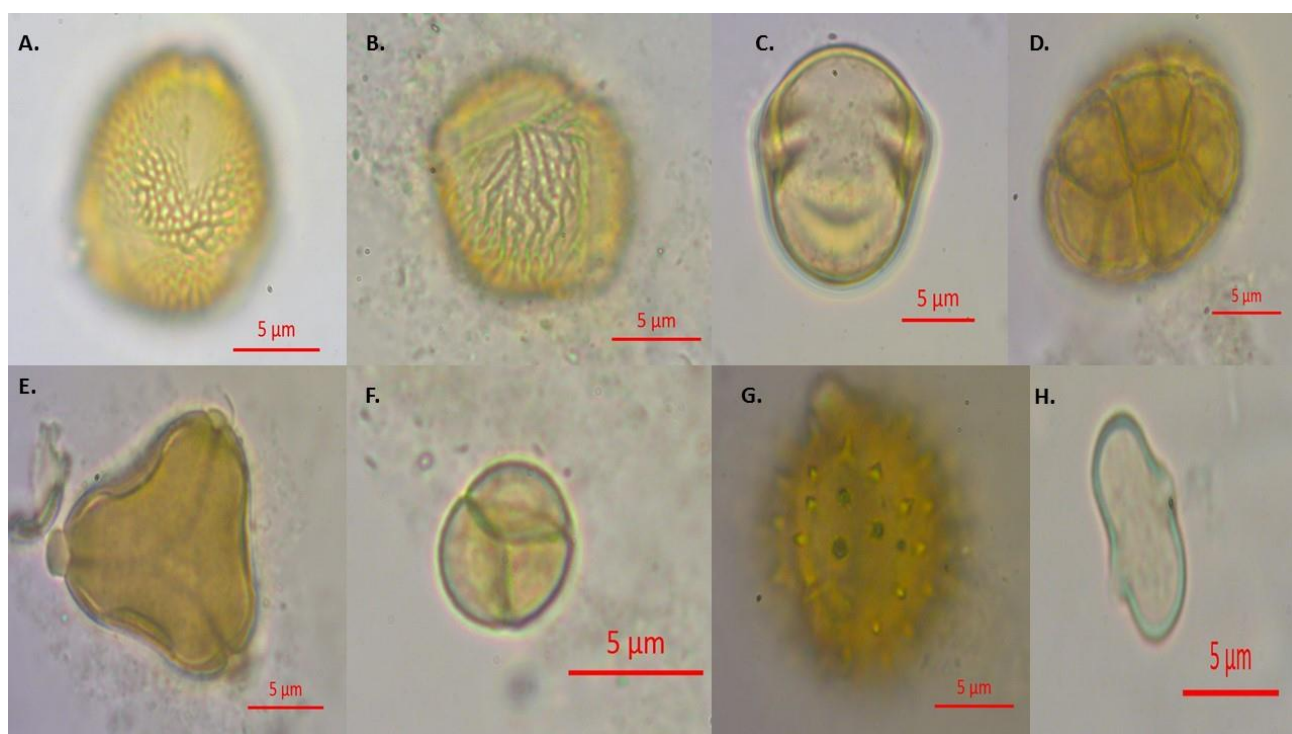
Para as amostras de méis declarados monoflorais de aroeira e o silvestre de Bodoquena, houve predominância da espécie *S. terebinthifolius*, aroeira vermelha, com

56,50% e 68,70% respectivamente, seguida nesses dois tipos de mel, de *Myracrodruon urundeuva*, aroeira preta, com 21,36% e 16,77% respectivamente, ambos, portanto poderiam ser declarados como monoflorais de aroeira vermelha.

Os méis silvestres de Campo Grande foram classificados como monoflorais de aroeira preta *M. urundeuva*, por apresentarem teor médio de pólen de 46,17%, sendo este o pólen dominante (PD), e 25,41% de aroeira vermelha *S. terebinthifolius*, pólen acessório (PA). A presença marcante das espécies *S. terebinthifolius* e *M. urundeuva* nos três demais tipos de mel deste estudo (declarados pelos produtores como méis de aroeira, silvestres produzidos em Campo Grande e em Bodoquena/ MS) contribuem para classificação da coloração das amostras como Âmbar Claro, e demonstram a predominância dessas floradas nos locais de produção dos méis, que trazem características comuns a estes tipos de méis, tais como cor, sabor e aroma. Aproximadamente 80 tipos polínicos foram encontrados em amostras de méis de Ubitatã e Nova Aurora - PR, na maioria caracterizados como heteroflorais, sendo mais de 50% dos tipos polínicos pertencentes a espécies nativas da região, tais como *S. terebinthifolius*, *Baccharis spp.*, *Alchornea triplinervea*, *Parapiptadenia rigida*, *Hexaclamys edulis*, *Zanthoxylum sp.* e *Serjania spp.*, indicando a importância da vegetação nativa para a sobrevivência das colônias e para a apicultura da região (SEKINE et al., 2013).

A identificação polínica dos méis é de suma importância pois traz informações a respeito da preferência florística das abelhas, além de ser indicativo da vegetação apícola de determinada região e também os períodos de produção de néctar pelas espécies utilizadas como substrato (BARTH, 1989; DUTRA e BARTH, 1997; BARTH 2005). Além disso, análise polínica nos méis é útil no controle de qualidade desse alimento, através dela comprova-se a procedência, e também é possível detectar adulterações (SODRÉ et al., 2011).

Os resultados obtidos com análise polínica das amostras demonstraram que os tipos florais declarados nos rótulos pelo apiário Vovô Pedro e da Agro HB, podem estar discordantes com as floradas predominantes de origem. Trata-se de um parâmetro importante, mas não exigido pela atual legislação brasileira de identidade e qualidade dos méis de abelha *A. mellifera*. A elucidação da origem polínica dos méis pode conferir ao produto um status único em função da composição florística, que dependendo da região produtora, não haverá no mundo produto com as características apresentadas.



**Figura 5** - Fotomicrografias em microscopia óptica de grãos de pólen coletados por *Apis mellifera*, nas amostras de méis produzidos em Mato Grosso do Sul, nos anos de 2015 e 2016. **A.** *Schinus trebinthifolius*; **B.** *Miracrodruon urundeuva*; **C.** *Protium* sp.; **D.** *Anadenanthera colubrina*; **E.** *Eucaliptus* sp.; **F.** *Mimosa* sp.; **G.** *Baccharis dracunculifolia*; **H.** *Cecropia pachystachya*.

### 5.3 – Compostos Bioativos

Os méis monoflorais e silvestres apresentaram teores significativos de fenóis totais, taninos, vitamina C e potencial de atividade antioxidante (Tabela 7).

**Tabela 7** – Valores médios de IC<sub>50</sub> (µg. mL<sup>-1</sup>), Fenóis totais (mg EAG.100 g<sup>-1</sup>) e Taninos (mg EAT.100 g<sup>-1</sup>) em méis do Estado de Mato Grosso do Sul.

Amostras	Atividade Antioxidante IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	Fenóis Totais (mg EAG.100g <sup>-1</sup> )	Taninos (mg.EAT100g <sup>-1</sup> )	Vitamina C (mg.100g <sup>-1</sup> )
CP	89,088 ± 2,961 <sup>b*</sup>	98,969 ± 1,672 <sup>b*</sup>	94,571 ± 2,0186 <sup>b</sup>	4,41 ± 0,34 <sup>c*</sup>
A	129,641 ± 10,80 <sup>c</sup>	104,340 ± 4,373 <sup>b*</sup>	82,476 ± 2,867 <sup>c*</sup>	4,4 ± 0,17 <sup>c*</sup>
SCG	78,364 ± 3,324 <sup>a</sup>	103,002 ± 1,354 <sup>b*</sup>	86,642 ± 4,027 <sup>c*</sup>	5,83 ± 0,37 <sup>b</sup>
SBDQ	88,043 ± 4,99 <sup>b*</sup>	123,082 ± 0,756 <sup>a</sup>	107,651 ± 4,0392 <sup>a</sup>	6,91 ± 0,59 <sup>a</sup>

Resultados expressos em média e desvio padrão\* Letras iguais não diferem estatisticamente na coluna (p>0,05). EAG – Equivalente de ácido gálico, EAT – Equivalente de ácido tânico. CP = amostras de mel de cipó-uva; A = amostras de mel de aroeira; SCG = amostras de mel silvestre Campo Grande; SBDQ = amostras de mel silvestre Bodoquena

As amostras SCG apresentaram melhor desempenho na atividade antioxidante, com  $IC_{50}$  de  $78,364 \mu\text{g. mL}^{-1}$  seguidas pelas CP e SBDQ, que não diferiram estatisticamente entre si. As amostras A obtiveram o menor desempenho na atividade antioxidante, com  $IC_{50}$  com  $129,641 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , dentre os méis analisados. Quanto menor a concentração da massa de amostra capaz de reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH (50% de inibição da oxidação) melhor é a capacidade da amostra de sequestro dos radicais livres fornecidos pelo DPPH (ROESLER et al., 2007).

É importante destacar que os compostos bioativos presentes nos méis são resultados das floradas de origem e o presente estudo observou uma discordância entre as floradas declaradas pelos produtores e o conteúdo polínico das amostras. Sendo assim, o mel silvestre produzido em Campo Grande, que deveria estar classificado como mel monofloral de aroeira preta, apresentou uma grande riqueza de espécies polínicas, o que pode estar relacionado ao seu melhor desempenho frente ao radical livre estável DPPH no meio reacional.

Lianda (2009) encontrou valores de  $IC_{50}$  entre  $6,17$  e  $30,60 \mu\text{g. mL}^{-1}$  em extratos etéreos de méis silvestres produzidos na região Sudeste. Lianda et al. (2012) encontraram para méis silvestres  $IC_{50}$  entre  $8,17$  a  $51,45 \mu\text{g. mL}^{-1}$ , valores entre  $5,48$  a  $52,87 \mu\text{g. mL}^{-1}$  em extratos aquosos acidificados de méis de florada de laranjeira oriundas de diferentes cidades dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, demonstrando nas amostras um melhor potencial antioxidante do que o encontrado no presente estudo de méis produzidos em Mato Grosso do Sul.

Os méis apresentaram teores de fenóis totais entre  $98,97$  (CP) a  $123,082 \text{ mg.}100 \text{ g}^{-1}$  (SBDQ), sendo este superior estatisticamente aos demais méis, podendo estar relacionado a riqueza florística identificada pelos grãos de pólen presentes nas amostras, e também em função da localidade (município de Bodoquena-MS), onde foram produzidas. Entretanto todos méis avaliados apresentaram maiores teores aos encontrados para méis monoflorais de laranjeira produzidos em algumas cidades da região Sudeste, cujos teores variaram de  $43,34$  a  $75,47 \text{ mg EAG.}100 \text{ g}^{-1}$  (LIRA et al., 2015) e produzidos no estado do Rio de Janeiro e São Paulo de  $12,72$  a  $76,65 \text{ mg.}100 \text{ g}^{-1}$ , além de variações entre méis silvestres de  $24,22$  a  $71,76 \text{ mg EAG.}100 \text{ g}^{-1}$  (LIANDA et al., 2012).

Em méis coletados durante um ano em Lavras-MG houve variações significativas dos teores de fenóis totais, com maiores teores de março a julho ( $42,96 \text{ mg EAG.}100 \text{ g}^{-1}$ ) e menores teores nos meses de outubro e novembro (respectivamente  $11,76$  e  $14,95 \text{ mg EAG.}100 \text{ g}^{-1}$ ), o que demonstra a variação nos teores de fenóis totais em relação às condições climáticas (JACOB, 2014).



Os valores médios de taninos totais variaram de 82,48 mg de equivalentes de ácido tânico.100 g<sup>-1</sup> para as amostras de A e 107,65 para SBDQ, que foi superior estatisticamente, assim como o teor de fenóis totais. Os méis A e SCG não apresentaram diferença significativa entre si com valores em torno de 84 mg.100 g<sup>-1</sup>, e CP com 94,57 mg.100 g<sup>-1</sup>.As amostras SBDQ, apesar de monoflorais de *S. terebinthifolius* (56,50% do conteúdo polínico), apresentaram uma grande variedade de conteúdo de pólen das mais variadas espécies, sendo assim, seus maiores teores neste teste podem estar relacionados a esta riqueza botânica, uma vez que os taninos são compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas.

Essas diferenças são resultantes das floradas de origem, localidade e clima, época do ano entre outros fatores que alterem os teores desses compostos nas floradas e por consequência no mel produzido funcional (BORSATO et al., 2009).

O teor de ácido ascórbico (vitamina C) obtido das amostras analisadas variou entre 4,4 a 6,91 mg .100 g<sup>-1</sup>, sendo que não houve diferença estatística entre os méis A e CP, com teores médios de 4,4 e 4,41 mg .100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. As amostras de méis SCG e SBDQ apresentaram os maiores teores para essa análise, sendo SBDQ com a maior concentração de vitamina C por porção de 100 g de amostra, 6,91 mg, e as amostras SCG com 5,83 mg de ácido ascórbico. 100 g<sup>-1</sup> de mel. O levantamento bibliográfico obtido por Silva et al. (2006) apontou valores médios de vitamina C de 0,5 mg.100 g<sup>-1</sup>, vale salientar que méis não são considerados fontes desse nutriente. Porém o presente estudo, detectou teores pelo menos oito vezes superiores ao valor médio de 0,5 mg.100 g de mel. Dessa forma, pode-se inferir que os teores consideravelmente superiores, são resultado da florada de origem dos méis e do local e época de produção do mel.

Além disso, é importante destacar que os méis deste estudo passaram todos por processamento, onde há o aumento da aeração do mel, favorecendo a oxidação e degradação do composto no mel, que é sensível ao peróxido de hidrogênio, produzido por enzimas presentes, e também a ação da glicose-oxidase, outra enzima presente no mel (CIULU et al., 2011).

#### 5.4 – Teste de inibição bacteriana por difusão em ágar

Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos em mm, cada amostra foi testada com uma placa de ágar MH para todas as cepas bacterianas utilizadas no estudo, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, constam na Tabela 8 e nas Figuras 6, 7 e 8 respectivamente. A inibição proporcionada pela azitromicina frente a cada cepa na Tabela 9.

**Tabela 8** – Halos de inibição do crescimento bacteriano (mm), das amostras, azitromicina e mel artificial.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<b>CP</b>	0 ± 0,0 <sup>Cc</sup>	20,75 ± 3,45 <sup>Aa</sup>	13,44 ± 3,43 <sup>Bb</sup>
Azt	11,33 ± 0,58	22,00 ± 2,00	0
Mel artificial	0	0	0
<b>A</b>	7,33 ± 1,03 <sup>Ca</sup>	22,66 ± 2,74 <sup>Aa</sup>	18,78 ± 3,11 <sup>Ba</sup>
Azt	11,66 ± 1,15	21,00 ± 1,00	0
Mel artificial	0	0	0
<b>SCG</b>	5,37 ± 0,53 <sup>Cb</sup>	20,44 ± 2,00 <sup>Aa</sup>	13,87 ± 2,90 <sup>Bb</sup>
Azt	14,33 ± 0,58	17,66 ± 1,52	0
Mel artificial	0	0	0
<b>SBDQ</b>	6,6 ± 0,55 <sup>Ca</sup>	16,12 ± 2,23 <sup>Bb</sup>	22,89 ± 3,18 <sup>Aa</sup>
Azt	13,66 ± 1,15	20,33 ± 1,15	0*
Mel artificial	0	0	0

Halos de inibição (mm) das amostras expressos em média e desvio padrão, letras maiúsculas diferentes houve diferença ( $p < 0,05$ ) estatística na linha, minúsculas na coluna. \*Duas das três amostras SDDQ (1 e 3) apresentaram halo de inibição de crescimento do mel artificial (8 e 12 mm). CP = amostras de mel de cipó-uva; A = amostras de mel de aroeira; SCG = amostras de mel silvestre Campo Grande; SBDQ = amostras de mel silvestre Bodoquena; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*; *E. coli* = *Escherichia coli*.

As variações nos tamanhos dos halos de inibição estão relacionadas ao tipo de confecção dos poços para inserção das amostras, antibiótico e controle positivo, feita com furador metálico autoclavado com 4 mm de diâmetro, onde os poços foram feitos a mão, tornando a profundidade dos poços minimamente variáveis nos testes.

O *S. aureus* é uma bactéria produtora da enzima catalase, capaz de neutralizar o peróxido de hidrogênio presente no mel, o que pode estar relacionado a não inibição do crescimento bacteriano em algumas amostras e a inibição mais discreta em outras. Cujos melhor desempenho apresentado no teste se deu pelas amostras de mel A, com média de halos de inibição de 7,33 mm, seguido das amostras SBDQ com 6,6 mm, logo as amostras SCG. As amostras CP não apresentaram inibição do crescimento bacteriano, tal qual o mel artificial. Bazoni (2012) obteve resultados ligeiramente superiores aos deste estudo ao inocular, utilizando a mesma técnica, méis declarados

monoflorais de romã, cana, caju, eucalipto, algaroba e assa-peixe, frente a *S. aureus* 25923, e halos de inibição maiores com amostras de mel de manuka.

Nas placas contendo a cultura de *E. coli* houve crescimento onde foi inserido o mel artificial (controle positivo). A bactéria foi sensível aos méis utilizados apresentando halos de inibição que foram de 22,66 para as amostras CP a 16,12 mm SBDQ. Resultados ligeiramente superiores aos obtidos por Bazoni (2012) ao testar essa cepa frente a diversos méis de *A. mellifera*, onde as amostras declaradas monoflorais de caju e romã apresentaram o melhor desempenho nesta análise, com halos médios <10 mm, cujo desempenho global dos méis utilizados foi inferior aos resultados observados para *S. aureus* 25923.

Nas as placas semeadas com *Salmonella spp.* o antibiótico não inibiu o crescimento bacteriano, sendo então resistente a este fármaco. Houve crescimento bacteriano onde foi inserido o mel artificial, tal qual esperado e o que ocorreu em todas as placas utilizadas no estudo. As amostras A e SCG apresentaram desempenhos semelhantes quanto aos halos de inibição para essa bactéria, havendo destaque para os méis SBDQ com os maiores halos de inibição

Todas as cepas não apresentaram sensibilidade ao mel artificial (xarope de açúcares 80% m/v), o que demonstra ausência do efeito osmótico resultante do alto teor de açúcares, de forma exclusiva, na inibição do crescimento bacteriano nas placas, uma vez que o objetivo do preparo e uso do controle negativo foi verificar se haveria crescimento bacteriano em uma alta concentração de açúcares. Com exceção das placas contendo as amostras SBDQ1 e SBDQ3, que apresentaram halos de inibição para o controle positivo nas placas de *Salmonella spp.* (Figura 7) que pode ter ocorrido em função da difusão com os halos de inibição dos méis.

**Tabela 9** – Halos de inibição das cepas frente ao antimicrobiano azitromicina (300 µg mL<sup>-1</sup>)

<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>
12,74 ± 1,74	20,24 ± 1,85	0,0 ± 0,0

Diâmetro dos halos de inibição (mm) expressos em média e desvio-padrão. *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*; *E. coli* = *Escherichia coli*.

*S. aureus* e *E. coli*, apresentaram sensibilidade ao antimicrobiano azitromicina, e as placas contendo *Salmonella spp.*, o fármaco se mostrou ineficiente, sendo esta

bactéria resistente a substância, que propiciou o crescimento bacteriano em todas as placas inoculadas com a bactéria.

### 5.5 – Teste da microdiluição para determinação da CIM e CBM

As concentrações das amostras diluídas para determinação das concentrações CIM e CBM constam na Tabela 10.

**Tabela 10** – Concentrações das amostras diluídas que promoveram efeito bactericida (CBM) e bacteriostático (CIM) em mg. mL<sup>-1</sup>.

	<i>S. aureus</i> (mg .mL <sup>-1</sup> )		<i>E. coli</i> (mg .mL <sup>-1</sup> )		<i>Salmonella spp.</i> (mg .mL <sup>-1</sup> )	
	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM
<b>CP</b>	-	0,795 ± 0,013 <sup>Cb</sup>	0,394 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,197 ± 0,003 <sup>Bb</sup>	-	0,098 ± 0,001 <sup>Aa</sup>
<b>A</b>	-	0,399 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	-	0,776 ± 0,007 <sup>Cc</sup>	-	0,381 ± 0,004 <sup>Ac</sup>
<b>SCG</b>	-	0,385 ± 0,003 <sup>Ba</sup>	1,563 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,784 ± 0,007 <sup>Cc</sup>	-	0,197 ± 0,002 <sup>Ab</sup>
<b>SBDQ</b>	-	0,382 ± 0,004 <sup>Ca</sup>	-	0,094 ± 0,004 <sup>Aa</sup>	0,382 ± 0,005	0,191 ± 0,002 <sup>Bb</sup>

(-) Não houve inibição do crescimento após plaqueamento em ágar MH. Letras maiúsculas diferentes houve diferença (p<0,05) estatística na linha, minúsculas na coluna. CP = amostras de mel de cipó-uva; A = amostras de mel de aroeira; SCG = amostras de mel silvestre Campo Grande; SBDQ = amostras de mel silvestre Bodoquena

Foi possível obter a concentração, onde a menor diluição apresentou inibição do crescimento bacteriano. Assim, as amostras do estudo apresentaram CIM frente a *S. aureus* que variaram de 0,382 mg mL<sup>-1</sup> para as amostras SBDQ, A e SCG e 0,795 mg mL<sup>-1</sup> para CP. Um estudo com a cepa de *S. aureus* 25923 observou CIM de 910, 845 e 780 mg mL<sup>-1</sup>, para méis monoflorais de cana, romã e caju, respectivamente

(BAZONI, 2012), concentrações superiores as encontradas nas amostras SBDQ, SCG e A, porém não houve atividade bactericida nas concentrações obtidas, diferente do estudo de Bazoni (2012), que apontou a CBM 975, 910 e 845 mg mL<sup>-1</sup>, para os méis monoflorais de cana, romã e caju, de *A. mellifera*.

Para *E. coli*, observou-se CIM média de 0,94 mg mL<sup>-1</sup> para as amostras SBDQ, seguida das amostras CP, com média de 0,197 mg mL<sup>-1</sup>, seguida das amostras A e SCG com CIM média de 0,784 e 0,776 mg mL<sup>-1</sup>, que não diferiram estatisticamente entre si. As amostras CP e SCG apresentaram CBM médias de 0,394 e 1,563, respectivamente. Bazoni (2012) obteve CBM de 975 mg mL<sup>-1</sup> frente a *E. coli* em mel monofloral de caju, concentração esta, quase 2,5 vezes superior à observada nas amostras CP do presente estudo.

As CIM médias observadas para *Salmonella spp.* variaram de 0,098 mg mL<sup>-1</sup> para amostras CP, seguida das amostras SCG e SBDQ com 0,197 e 0,191 mg mL<sup>-1</sup>, que não diferiram estatisticamente entre si, e com maior CIM para esta cepa as amostras A com 0,381 mg mL<sup>-1</sup>. Apenas as amostras SBDQ apresentaram CBM média de 0,382 mg mL<sup>-1</sup>, as demais não apresentaram atividade bactericida, apenas bacteriostática, porém em concentrações bem baixas como as observadas nas amostras CP.

As amostras CP apresentaram as menores CIM para a cepa de *Salmonella*, onde também as amostras A e SCG foram mais bacteriostáticas, as amostras SBDQ se mostraram mais potentes contra a cepa de *E. coli*, e com maior resistência aos méis do estudo, *S. aureus*, demonstrando uma menor sensibilidade a eles, tal qual no teste de difusão no ágar.

A microdiluição com a azitromicina, frente as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, os poços das diluições feitas, de 1:1 a 1:32 não apresentaram indícios de crescimento bacteriano, e após o plaqueamento em ágar MH também não apresentaram crescimento, o que indica que para ambas bactérias, a CIM e CBM foi de 9,375 µg mL<sup>-1</sup>, após esta diluição houve crescimento bacteriano. Para a cepa *Salmonella spp.* apresentou resistência ao fármaco a partir da diluição 1:4, ou seja, a partir da concentração 3,75 µg (75 µg mL<sup>-1</sup>) de azitromicina no poço, houve crescimento bacteriano. O caldo inoculado sozinho para fins de comparação, não apresentou crescimento bacteriano em nenhum dos poços revelados em resazurina, o que foi confirmado após o plaqueamento em ágar MH, o mel artificial apresentou metabolismo bacteriano evidenciado pela resazurina, tal qual no teste da difusão em ágar, e confirmado pelo plaqueamento desde a concentração 1:1. Portanto, a atividade

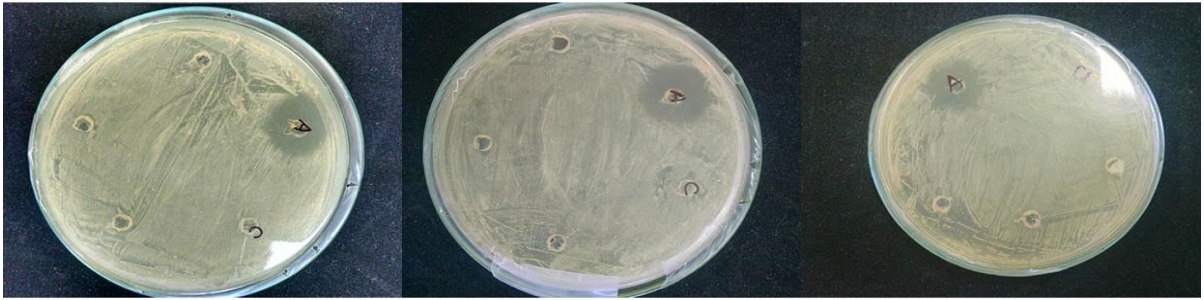
antimicrobiana dos méis não está associada ao efeito da alta pressão osmótica, uma vez que o mel artificial, preparado com 80% (m/v) de açúcares, teor aproximado os encontrados nos méis do estudo, propiciou crescimento bacteriano para as três cepas desde o teste de difusão em ágar, mantendo o comportamento mesmo diluído, nas mesmas condições das amostras, no teste da microdiluição em caldo MH, confirmados com o plaqueamento em ágar MH. Bazoni (2012) obteve o mesmo resultado com o mel artificial em seu estudo, desde a inoculação nos poços para verificação da inibição do crescimento bacteriano e também no teste da microdiluição, não obtendo CIM e nem CBM para o preparado de açúcares.



1

2

3



4

5

6



7

8

9



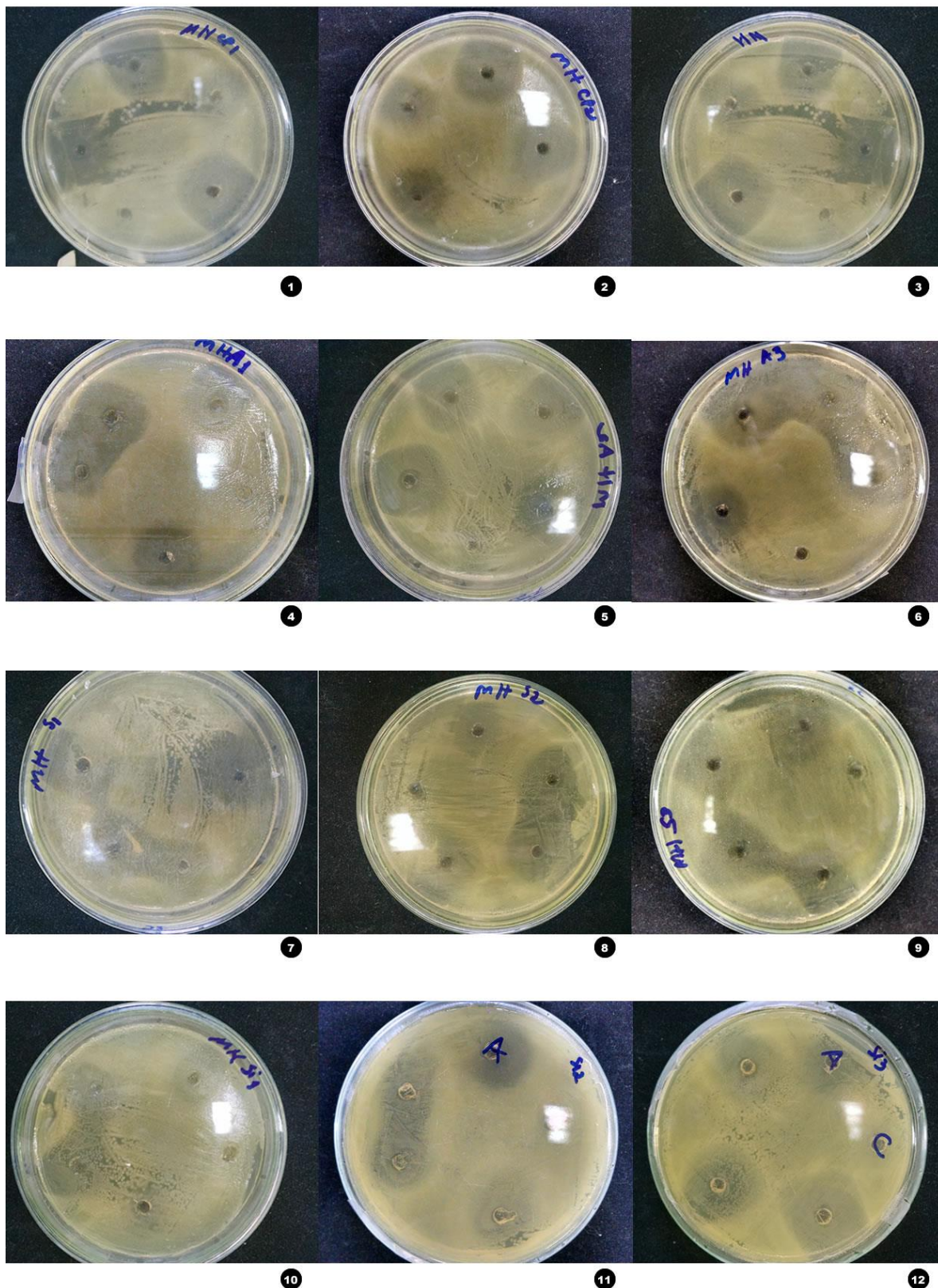
10

11

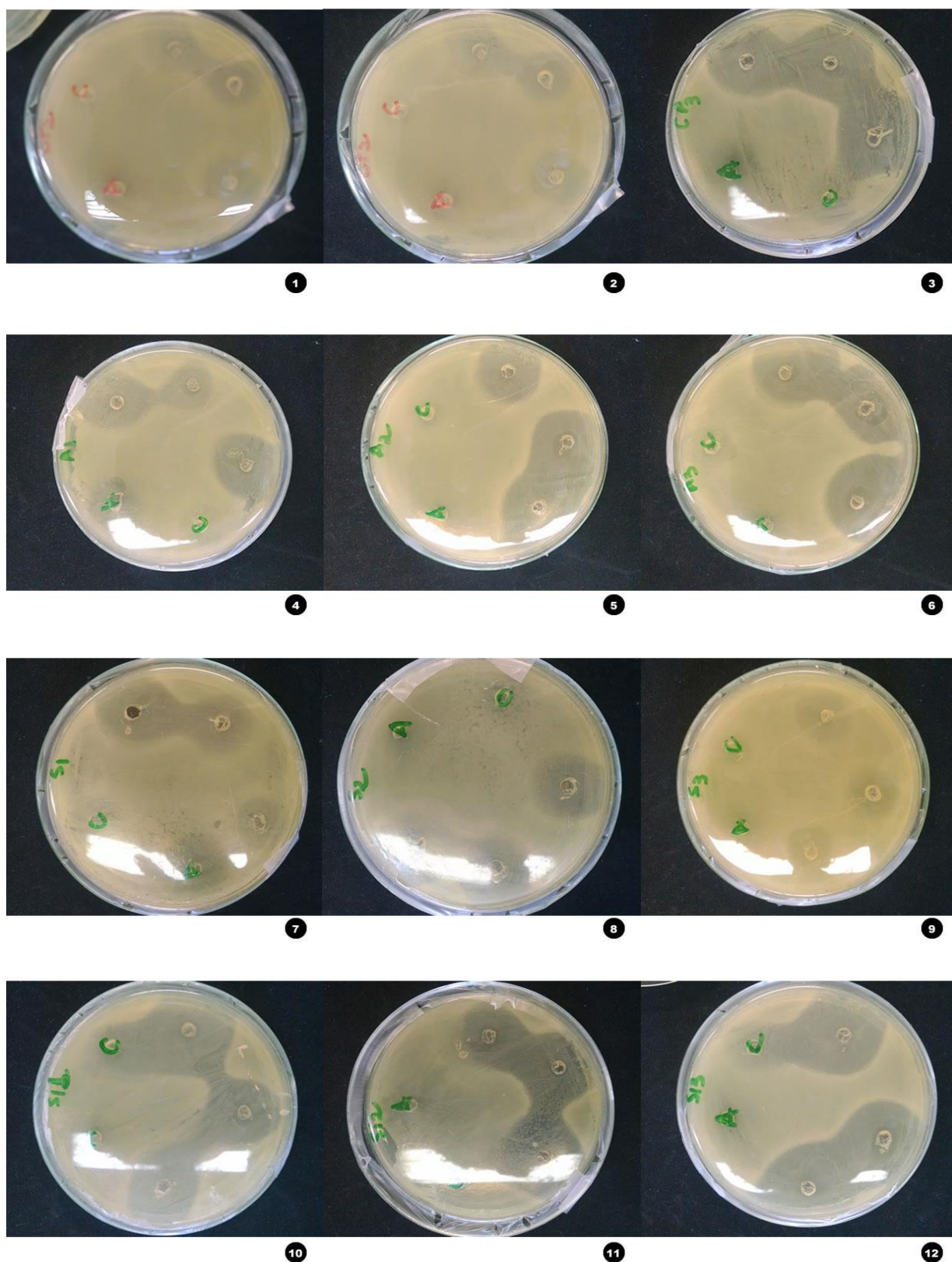
12

**Figura 6** – Halos de inibição de crescimento de placas de ágar Mueller-Hinton semeadas com *Staphylococcus aureus*. Placas 1, 2 e 3: mel monofloral de cipó-uva; 4,5 e 6: mel monofloral de aroeira; 7,8 e 9: mel silvestre Campo Grande e 10, 11 e 12: mel silvestre de Bodoquena. C: mel artificial, A: antibiótico azitromicina 300 µg .mL<sup>-1</sup>.





**Figura 7** – Halos de inibição de crescimento de placas de ágar Mueller-Hinton semeadas com *Escherichia coli*. Placas 1, 2 e 3: mel monofloral de cipó-uva; 4,5 e 6: mel monofloral de aroeira; 7,8 e 9: mel silvestre Campo Grande e 10, 11 e 12: mel silvestre de Bodoquena. C: mel artificial, A: antibiótico azitromicina 300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .



**Figura 8** – Halos de inibição de crescimento de placas de ágar Mueller-Hinton semeadas com *Salmonella* sp.. Placas 1, 2 e 3: mel monofloral de cipó-uva; 4,5 e 6: mel monofloral de aroeira; 7,8 e 9: mel silvestre Campo Grande e 10, 11 e 12: mel silvestre de Bodoquena. C: mel artificial, A: antibiótico azitromicina 300  $\mu\text{g}$  .mL<sup>-1</sup>.

## 6. Conclusão

Os méis denominados monoflorais de cipó uva e aroeira, assim como os silvestres de Campo Grande e de Bodoquena apresentam 100% de conformidade em todos os parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade exigidos pela legislação brasileira, a Instrução Normativa 11 de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000).

O mel monofloral de cipó-uva possui coloração classificada em extra âmbar claro, e as demais amostras âmbar-claro.

Os méis analisados apresentam origem polínica com predominância das espécies *Schinus. terebinthifolius*, aroeira vermelha, e/ou *Myracrodruon urundeuva*, aroeira preta. Porém a legislação brasileira não exige análise polínica do produtor para que o mel seja comercializado.

O potencial antioxidante e teor de bioativos encontrados nas amostras podem ser considerados relevantes em todos méis analisados, com destaque para as amostras declaradas silvestres produzidas em Campo Grande e Bodoquena.

Foi observada sensibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus*, e das enterobactérias *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, frente aos méis estudados, confirmando as propriedades antimicrobianas das amostras, devido a presença de substâncias capazes de inibir o crescimento bacteriano bem como a morte nos meios reacionais. Portanto, faz-se necessário o aprofundamento dos estudos dos méis de *Apis mellifera* produzidos em Mato Grosso do Sul, a fim de elucidar sua composição.

## 7. Referências Bibliográficas

- ABADIO FINCO, F. D. B.; MOURA, L. L.; SILVA, I. G. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 30, n. 3, p. 706-712, 2010.
- ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, p. 1–15, 2009
- ALMEIDA-ANACLETO, D A.; MARCHINI, L. C. Composição físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. provenientes do Cerrado Paulista. **Boletim de Indústria animal**, v. 61, n. 2, p. 161-172, 2004.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PENTEADO, M. V. C. Vigilância Sanitária: Tópicos sobre legislação e análise de alimentos – 2ed- Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2015 cap. 10 p. 140.
- ALQARNI, A. S.; OWAYSS, A. A.; MAHMOUD, A. A. Mineral content and physical properties of local and imported honeys. **Saudi Arabia. Journal of Saudi Chemical Society**, v.5, 618 – 625 2012.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. TULIPANI, S. DIA, D. ESTEVEZ, Y. ROMANDINI, S. GIAMPIERI, F. DAMIANI, E. ASTOLFI, P. BOMPADRE, S. BATTINO, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several mono floral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**. 48:2490-2499, 2010.
- ALVES, T. T. L. **Potencial do cipó-uva (*Serjania lethalis*) como fonte de néctar para a exploração apícola na Chapada do Araripe**. 2013, 197f. Tese (doutorado integrado em zootecnia). Centro de ciências agrárias, UFC, Fortaleza, 2013.
- ALVES; T. T. L., SILVA; J. N., de MENESES, A. R. V.; de HOLANDA NETO, J. P. Caracterização físico-química e avaliação sensorial dos méis produzidos por abelhas *Apis mellifera* L. oriundos de diversas floradas da região do Cariri Cearense. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 2, p. 169-175, 2011.
- ARAÚJO, D. R. SILVA, R. H. D. SOUSA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade de Crato, CE. Crato-CE: **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, Jan./Jun., 2006.
- AROUCHA, E. M. M.; OLIVEIRA, A. J. F.; NUNES, G. H. S.; MARACAJÁ, P. B.; SANTOS, M. C. A. Qualidade do mel de abelha produzidos pelos incubados da lagram e comercializados no município de Mossoró/RN. **Caatinga (Mossoró, Brasil)**, v. 21, n. 1, p. 211-217 jan – mar. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE MEL- ABEMEL. Estatísticas. Exportações brasileiras entre 2009 e 2013. Disponível em: <http://www.abemel/estatisticas.htm>. Acesso em: 20 de jan. 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 15th. ed. Arlington: A.O.A.C., 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed. Arlington: A.O.A.C., 1997.

AUBERT, S.; GONNET, M. Measure de la couleur des miels. **Apidologie**, Paris, v.14, p. 105-118, 1983.

AZEREDO, M.A.A., AZEREDO, L.C., DAMASCENO, J.G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidelis-RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 3-7, 1999

BACAXIXI, P.; BUENO, C.; RICARDO, H.; EPIPHANIO, P. D.; SILVA, D. P.; BARROS B. M. C.; SILVA, T. F.; BOSQUÊ G. G.; LIMA, F. C. C. Importância da apicultura no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 10, n. 20, 2011.

BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989. 150p.

BARTH, O. M. Botanical resources used by *Apis mellifera* determined by pollen analysis of royal jelly in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v.44, n.2, p.78-81, 2005.

BATLOUNI M. Hipótese oxidativa da aterosclerose e emprego dos antioxidantes na doença arterial coronária. **Arq Bras Cardiol**. n.68 p. 55-63 1997.

BAZONI, M. O. **Atividade antimicrobiana do mel produzido por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil**. 2012. 116 f. 2012. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Ciências: Área de Concentração em Genética)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

BERA, A. **Efeitos nas Características Físico-Químicas, Microbiológicas e Sensoriais em Amostras de Mel de Abelhas Submetidas à Radiação Gama**. 2010. 112f. Tese (Doutorado em ciências na área de tecnologia nuclear) – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BERA, A. **Composição Físico-Química e Nutricional do Mel Adicionado com Própolis**. São Paulo. 2004. 59 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

BIANCHI, E. M.; La miel, características y composición, Análisis y Adueraciones, **UNSE-CEDIA**: Santiago Del Estero, 1981.

BOGDANOV, S.; LÜLLMANN, C.; MARTIN P. C. Honey quality methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. *Mitt. Gerbeite Lebensm*, v. 90, p. 1-15, 2000.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P. C.; LÜLLMANN, C. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, p. 1-59, 1997.

BONI, A.; PUGLIESE, C.; CLÁUDIO, C. C.; PATIN, R. V.; OLIVEIRA, F. L. C. Vitaminas antioxidantes e prevenção da arteriosclerose na infância. *Revista Paulista de Pediatria*. v. 28, p. 373-380 2010.

BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Le miel: origine et composition. *Actualités pharmaceutiques*, 531, 18-21. 2013.

BORSATO, D. M. **Composição química, caracterização polínica e avaliação de atividades biológicas de méis produzidos por meliponíneos do Paraná**. 2013. 153f. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BORSATO, D. M.; CRUZ, M.C.R.; ALMEIDA, M.M. Atividade antimicrobiana de méis comercializados na região dos Campos Gerais. 10:48-53, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 42 de 30 de agosto de 2013. Dispõe sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. **D.O.U. [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2013.

BRASIL IAL. **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. *Normas Analíticas*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 5 ed., 2005

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. **D.O.U. [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 de outubro de 2000.

BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº. 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Apícolas. **D. O.U. [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, de 23 de janeiro de 2001, p.18-23, 2001.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução–CNNPA nº 12, de 24 de julho de 1978. **D.O.U. [da] República Federativa do Brasil**. 1978.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368 de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. **D. O. U. [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 06, de 25 de julho de 1985. Aprova as normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para mel, cera de

abelhas e derivados. **D. O. U.[da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1985.

BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. Cadeia produtiva de flores e mel. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Política Agrícola; Instituto Interamericano de Cooperação para Agricultura. Brasília, 140p. 2007

CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. D. M.; LOPES, M. D. R.; WOLFF, L. F. Mel: características e propriedades. **Embrapa Meio-Norte. Documentos** 2006.

CAMARGO, R. C. R. de. Boas Práticas de Manipulação na Colheita de Mel. **Comunicado Técnico. Embrapa Meio Norte, 2002.**

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. Classificação do mel floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 1-5, jan-abr. 2003.

CARDOSO FILHO, N.; SORIANO, R.; SIENA, D. Avaliação do mel comercializado no mercado municipal em Campo Grande–Mato Grosso do Sul. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 294-301, 2012.

CARDOSO FILHO N.; COELHO R. M., RODRIGUES A., MIGUEL R. M.; CAMARGO T. R. C. Avaliação físico-química de méis comercializados em algumas cidades do Estado de Mato Grosso do Sul. **Ensaio e Ciência: Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde**, v. 15: p. 135-146 2011.

CARVALHO, C. A. L.; ALMEIDA SOUZA, B.; SILVA, G. S.; MARCHINI, L. C.; OLIVEIRA, R. M. A. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. **Insecta-Núcleo de Estudos dos Insetos**, 2005.

CIULU, M.; SOLINAS, S.; FLORIS, I., PANZANELLA, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C. Determination of water-soluble vitamins in honey. **Talanta**, 83, 924–929 2011.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Clinical laboratory standards, Wayne – Pennsylvania, 2006. Disponível em: <http://www.clsi.org>. Acesso em: 23 de Jan. 2017.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Clinical laboratory standards, Wayne – Pennsylvania, 2003. Disponível em: <http://www.clsi.org>. Acesso em: 23 de Jan. 2017.

COIADO, D. G. S. **Caracterização do setor apícola do Mato Grosso do Sul: apelação de origem controlada e indicação geográfica como possibilidade de valorizar e diferenciar o mel da região central e sudoeste do estado**. 2011. 153f. Dissertação (Desenvolvimento local) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2011.

CORBELLA, E.; COZZOLINO, D. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. **Food Science and Technology**, London, v.39, n.5, p.534-539, 2006.

- CRANE, E. **Honey**. London: Morrison and Gibb, 608p 1975.
- CRANE, E. **O livro do mel**. 2.ed. São Paulo. Livraria Nobel, 226p 1987.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos** 4ª Ed. (Artmed) 2010.
- DUTRA, V. M. L.; BARTH, O. M. Análise palinológica de amostras de mel da região de Bananal (SP/RJ). *Revista Universidade de Guarulhos - Geociências II*. p. 174-183. 1997.
- EMBRAPA MEIO NORTE** (Terezina-PI). Mel: características e propriedades, ISSN 0104-866X. Versão Eletrônica, dez 2006.
- EMBRAPA MEIO NORTE (Terezina-PI) **Apicultura**: Sistema de Produção ,3.ISSN 1678-8818. Versão Eletrônica, Jun 2002.
- EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S. D. A.; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões do estado da Paraíba. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166-1171, 2005.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat: Trade exports country by commodity. FAO, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>>. Acesso em: 15 de junho de 2015.
- FEDERAÇÃO DE APICULTURA e MELIPONICULTURA DE MATO GROSSO DO SUL – FEAMS. Dados micro-regiões de Mato Grosso do Sul, 2010. Disponível em <http://feams.com.br>. Acesso em: 17 de jan. 2015.
- FERREIRA, A. C.; NEVES, R C. F; MARTINS, O. A. métodos quantitativos e qualitativos de determinação de 5-hidroximetilfurfural em diferentes tipos de mel. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 4, n. 3, p. 19-23, 2014.
- FERREIRA, A. B. B. Pantanal Mato-Grossense: considerações sobre a proteção constitucional para um desenvolvimento econômico sustentável. **Interações**, Campo Grande, v. 14, n. 1, p. 11-20, jan – jun 2013.
- GALLO, D. N., NETO, O. S., CARVALHO, S., BAPTISTA, R. P. L. **Entomologia agrícola**. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz 2002.
- GONÇALVES, L.S. A influência do comportamento das abelhas africanizadas na produção, capacidade de defesa e resistência às doenças. *Anais do I Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto*; p. 69-79 1994.
- GONZÁLES, A. P.; BURIN, L.; BUERA, M. P. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. **Food Research International**, v.32, p. 185-191, 1999.
- GUEZ, M. A. U.; ALVES, A. R. C.; RAMOS, B. F. M.; MACHADO, B. A. S. Estudo prospectivo de produtos derivados do mel associado ao álcool e tecnologias correlatas



- sob o enfoque em documentos de patentes. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 2, p. 115, 2013.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo Agropecuário 2010. Disponível em <http://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo?view=noticia&id=1&idnoticia=2487&busca=1&t=ppm-2012-cenario-pouco-favoravel-rebanhos>. Acesso em 17 de jan. 2015.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo Agropecuário 2013. Disponível em <http://censo2013.ibge.gov.br/noticias-censo?view> . Acesso em 17 de jan. 2015.
- JACOB, M. A. M. Compostos fenólicos, atividade antioxidante e características físico-químicas de mel e pólen coletados por *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). Universidade Federal de Lavras. Tese Doutorado 2014.
- JONES, G. D.; BRYANT JR, V. M. The use of ETOH for the dilution of honey. *Grana*, v. 43, n. 3, p. 174-182, 2004.
- JONES, D. P. Antioxidant redox signal. *Analytica Chimica Acta*, v. 8, p. 1865-1879, 2006.
- KERR, W. E. Distribuição da abelha africanizada em seus limites ao sul. **Ciência e Cultura**, v. 34, p. 499-502 1989.
- KHOSRAVI, A. R.; HOJJATOLLAH, S.; FARZAD, K.; TAHEREH, Z.; MOHAMMAD F. Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species. **Journal of apicultural**. v 47 (4) p. 256-260. 2008.
- KOMATSU, S. S.; MARCHINI, L. C.; DE MORETI, A. C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 22, n. 2, p. 143-146, 2002.
- KORB, A.; NAZARENO, E. R.; MENDONÇA, F. A.; DALSENTER, P. R. Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. **Rev Biol Ciênc Terra**, v. 13, p. 72-79, 2013.
- LACERDA, J. J. J.; SANTOS, J. S.; SANTOS, S. A.; RODRIGUES, G. B.; SANTOS, M. L. P. Influência das características físico-químicas e composição elementar nas ores de méis produzidos por *Apis mellifera* no Sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada. **Química Nova**. 33:1022-1026, 2010

- LABORATORIO, DE REFERENCIA ANIMAL. -LANARA Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Métodos físico e químicos. Brasília (Brasil): Ministério da Agricultura, v. 2, p. 25, 1981.
- LEMOS, G. S.; SANTOS, J. S.; SANTOS, M. L. P. Validação do método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. **Química Nova**. V. 33 p. 1682-1685 2010.
- LIANDA, R. L. P.; SANT'ANA, L. D.; ECHEVARIA, A.; CASTRO, R. N. Antioxidant activity and phenolic composition of brazilian honeys and their extracts. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 4, p. 618-627, 2012.
- LIANDA, R. L. P. Tese de Doutorado. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. PPGQO-UFRRJ. 2009.
- LIRA, A. F.; MELLO SOUSA, J. P. L.; LORENZON, M. C. A.; VIANNA, C. A. F. J.; CASTRO, R. N. Estudo comparativo do mel de *Apis mellifera* com méis de meliponíneos de diferentes regiões. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.3, p. 169-178 2015.
- LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013
- LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWAHL, G. Methods of Melissopalynology. **Bee World**, v.59, n.4, p.139-157, 1978.
- LOUVEAUX J; MAURIZIO A.; VORWAHL G. 1970. Methodik der melissopalynologie. **Apidologie** 1: 193-209.
- LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**. v. 339, 520-532, 1998.
- MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S.; MORETI, A. C. D. C. C.; OTSUK, I. P. Composição físico-química de amostra de méis de *Apis mellifera* L. do Estado de Tocantins, Brasil. **Boletim de Indústria Animal**, v. 61, n. 2, p. 101-114, 2004.
- MARCHINI, L. C. Caracterização de amostras de méis. **Indústr. anim.**, N. Odessa, v.61, n.2, p.161-172, 2004 de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", 2001. 83 f. Tese de Livre Docência
- MARTINEZ, O. A.; SOARES, A. E. E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Ver. Bras. Saúde Prod. Animal**, Salvador, v.13, n.4, p.982-990, out./dez., 2012
- MATEO, R.; BOSH-REIG, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Columbus, v. 46, n. 1, p. 393-400, 1998.

- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p.639-644, 2006.
- MELO, Z. F. N.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. **Ver. Bras.prod. agroindustriais**. Campina Grande, v.5, n.1, p.87-97, 2003.
- MENDES, E., PROENÇA, E. B., FERREIRA, I. M. P. L. V. O., FERREIRA, M. A. Quality evaluation of Portuguese honey. **Carbohyd Polym**, v.37,p. 219-223, 1998.
- MENDONÇA, K.; MARCHINI L. C.; SOUZA B. A.; ANACLETO D. A.; MORETI A. C. C. C.. Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por *Apis mellifera* L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo. **Ciência Rural**, v. 38 p. 1748-1753 2008.
- MIRAGLIO, A. M. M. Honey-health and therapeutic qualities. 2003 Disponível em: <http://nhb.org/techfood>. Acesso em: 17 de jan. 2015.
- MOLAN, P. C. Why honey is effective as a medicine. 1. Its use in modern medicine. **Bee World**, v. 80, n. 2, p. 80-92, 1999.
- MORAES, F. P; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. Revista eletrônica de farmácia, v. 3, n. 2, 2006.
- MORETI, A. C. C C.; SILVA SODRÉ, G.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. Cor de amostras de mel de *Apis mellifera* L. de diferentes estados brasileiros. **Boletim de Indústria Animal**, v. 63, n. 3, p. 159-164, 2006.
- MOURA, S. G. **Boas práticas apícolas e a qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus**, 1758. 2010. 76f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.
- MOURA, S. G. **Qualidade do mel de abelhas (*Apis mellifera* L.) em função do ambiente e do tempo de armazenamento**. 2006. 64f.Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.
- NETO, F. L. D. P.; NETO, R. M. D. A. Principais mercados apícolas mundiais e a apicultura brasileira. In: CONGRESSO DA SOBER. 52, 2005. Riberão Preto. Anais Eletônicos. Disponível em <http://www.sober.org.br/palestra/2/1085.pdf>. Acesso em 16 de jan. 2015.
- OLIVEIRA, M. L; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica. **Acta Amazônica**, v. 35, n. 3, p. 389-394, 2005.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A; CAMACHO, M; GUERRA, H; SWINGS, J; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug

resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:2720-2. 2002.

PEREIRA, F. M. Avaliação e substituição de rainhas de abelhas africanizadas. **Jornal Agrosoft Brasil**, 24 dez 2011. Disponível em <http://www.agrosoft.org.br/agropag/103582.htm>

PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R.; VILELA, S. L. O. Embrapa Meio-Norte. Sistema de produção 3. Produção de Mel jul. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeprocao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/mel.htm> . Acesso em 21 jan. 2015.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. **Rev. Nutr.** Campinas. v. 17, n. 3, p. 319-326, 2004

POTT, A.; POTT V. J. Inventário da flora apícola do Pantanal de Mato Grosso do Sul. Embrapa – Centro de pesquisa agropecuária do Pantanal. ISSN 0102-7727, set. 1986. QUEIROGA, C. F. M. A.; LEITE FILHO, F. G.; MACHADO, A. V.; OLIVEIRA COSTA, R. Cadeia Produtiva do Mel de Abelhas: Fonte Alternativa de Geração de Renda para Pequenos Produtores e Qualidade Físico-química do Mel. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 5 n. 1, p. 24-30 2015.

REIS, V. D. A. Mel Orgânico: Oportunidades e Desafios para a Apicultura no Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 26 p. Série **Documentos / Embrapa Pantanal**.

RIQUE, A. B.; SOARES, E. A.; MEIRELLES C. M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev Bras Med Esporte** v. 8 p. 244-54 2002.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUZA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

SANTOS, D C.; DE OLIVEIRA, E. A. Características físico-químicas e microbiológicas de méis de *Apis mellifera* L. provenientes de diferentes entrepostos. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 67-74, 2013.

SEKINE, E. S. et al. Melliferous flora and pollen characterization of honey samples of *Apis mellifera* L., 1758 in apiaries in the counties of Ubiratã and Nova Aurora, PR. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n. 1, p. 307-326, 2013.

SEREIA, M. J. et al. Physicochemical characteristics and pollen spectra of organic and non-organic honey samples of *Apis mellifera* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 8, n. 3, p, 1077-1090. 2011.

- SILVA, S. J. N. D., SCHUCH, P. Z., VAINSTEIN, M. H., & JABLONSKI, A. (2008). Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28 n. supl.1, p.46-50, 2008.
- SILVA, M. B. L. **Diagnóstico do sistema de produção e qualidade do mel de *Apis mellifera***, 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- SILVA, R. A.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; COSTA, J. M. C. Composição e atividade terapêutica do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara. V. 17, n. 1, p. 113-120, jan-mar. 2006.
- SILVA, C. L.; QUEIRÓZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterização físicoquímica de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, 2004.
- SILVEIRA, F. A; MELO, G. A. R. & ALMEIDA, E. A. B. 2002. As abelhas brasileiras: Sistemática e Identificação. Belo Horizonte, **Fundação Araucária**, 253p.
- SCHRAMM, D. D.; KARIM, M.; SCHRADER, H. R.; HOLT, R. R.; CARDETI, M.; KEEN, C. L. **J. Agric. Food Chem**, v. 51, p. 1732, 2003
- SODRÉ, G. S., MARCHINI, L. C., MORETI, A. C. D. C. C., OTSUK, I. P.; CARVALHO, C. A. L. D. Physico-chemical characteristics of honey produced by *Apis mellifera* in the Picos region, state of Piauí, Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1837-1843, 2011.
- SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolics constituents of prumus domestica: the quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Food Science and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.
- TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 69, n. 3, p. 217-225, 2001.
- TERNOSKI, S., KUSMA, M., MACOHON, E. R., KLOSOWSKI, A. L., & ANTONELI, V. apicultura e associativismo no município de Prudentópolis 2009
- TERRAB, A.; PONTES, A.; HEREDIA, F. J.; DIEZ, M. J. Characterization of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. **Food Chemistry**, London, v.88, n.4, p.537-542, 2004
- TERRAB, A.; DIEZ, M. J.; HEREDIA F. J. Palynological physicochemical and colour characterization of Moroccan honeys. II. Orange (*Citrus* sp.) honey. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.38, p.387-394, 2003.
- USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE Disponível em: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. Acesso em 20 de jan. 2015.

VIEIRA, G. H. C. Análise faunística de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) e tipificação dos méis produzidos por *Apis mellifera* L., em área de cerrado do município de Cassilândia/MS. 2005. 97f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo 2005.

WIESE, H. **Nova Apicultura**. 7 ed. Porto Alegre: Agropecuária, 493 p., 1986

WIESE, H. **Novo manual de apicultura**. Guaíba: Livraria Editora Agropecuária, 292 p.1995.

WOOTTON, M.; EDWARDS, R. A.; FARAJI-HAREMI, R. Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honey. 2. Changes in sugar and free amino acid contents. **Journal of Apicultural Research**, Bucharest, v. 15, p.29-34, 1976.