



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO



***MEL DE ABELHAS NATIVAS E AFRICANIZADAS DO
ESTADO DE ALAGOAS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA E ATIVIDADE
TERAPÊUTICA***

Alysson Wagner Fernandes Duarte

Maceió, Abril de 2009

Alysson Wagner Fernandes Duarte

***MEL DE ABELHAS NATIVAS E AFRICANIZADAS DO
ESTADO DE ALAGOAS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA E ATIVIDADE
TERAPÊUTICA***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Nutrição da Universidade Federal de Alagoas
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Nutrição – área de concentração:
Análise de Alimentos e Segurança Alimentar.

Orientadora: **Prof^a Dr^a. Ana Maria Queijeiro López**

Maceió, Abril de 2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- D812m Duarte, Alysson Wagner Fernandes.
Mel de abelhas nativas e africanizadas do estado de Alagoas : composição química, segurança microbiológica e atividade terapêutica / Alysson Wagner Fernandes Duarte, 2009.
141 f : il.
- Orientadora: Ana Maria Queijeiro López.
Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2009.
- Bibliografia: f. 99-116.
Apêndices: f. 117-141.
1. Mel de abelha. 2. Meliponicultura. 3. Parâmetros físico-químicos. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade antimicrobiana. 6. *Clostridium* sp. 7. *M. scutellaris*. 8. *M. quadrifasciata*. 9. *M. subnitida*. 10. *Plebeia* sp. I. Título.

CDU: 595.799



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
BR 104 Km 14 Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/ fax: 81 3214-1160



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO

**“MEL DE ABELHAS NATIVAS E AFRICANIZADAS DO ESTADO DE
ALAGOAS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA E
ATIVIDADE TERAPÊUTICA”**

por

ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE

A Banca Examinadora, reunida aos 30 dias do mês de abril do ano de
2009, considera o candidato **APROVADO**.

Profa. Dra. ANA MARIA QUEIJEIRO LÓPEZ - Orientadora
Instituto de Química e Biotecnologia-IQB
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Dra. LÚCIA MARIA CONSERVA
Instituto de Química e Biotecnologia-IQB
Universidade Federal de Alagoas

Profa. Dra. Giselda Macena Lira
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas

Do alto da pedra
Eu busco impulso
pra saltar
Mais alto que antes
Bem mais que tudo
eu quero ir
Uma vez que faz-me
sentir alguém
É pra todo sempre,
não quero minha
vida
Igual a tudo que se
vê...

GUILHERME SÁ

DEDICATÓRIA

A Deus, Maiorial da Vida e Fonte de Sabedoria Eterna.

A minha Família, em especial meus pais, Jorge e Lourdes pelos ensinamentos de vida, honestidade, compromisso, trabalho e pela enorme contribuição na minha formação...

A minha esposa Rafaela, pelo Companheirismo, Confiança, Amor, Dedicção e Compreensão...

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo Dom da Vida, pela Sabedoria Maior, e pela Força concedida nessa jornada, Muito Obrigado!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Banco do Nordeste S.A., pelo suporte financeiro no projeto intitulado “Monitoramento e caracterização da qualidade microbiológica e físico-química de pólen e mel de abelhas nativas e africanizadas do litoral, agreste e sertão de Alagoas”;

À Universidade Federal de Alagoas, pela estrutura que, mesmo limitada, foi essencial a realização deste trabalho;

À minha Orientadora Ana Maria Q. López, que Muito contribuiu para viabilização desta dissertação, pessoa ímpar, sem a qual não teria passado por todo o aprendizado nessa longa jornada, algo que vai além da bancada de experimentos. Prof^a, Obrigado por ter confiado em mim e em especial por sua amizade. Parabéns pela luta na melhoria da Educação deste Estado!

Ao Prof. Sílvio Chagas, pela colaboração no delineamento estatístico deste trabalho – uma pessoa de alma nobre, um cientista engajado com a Ciência;

Aos Professores membros das bancas de avaliação, em especial á Profa. Dra. Lúcia Maria Conserva e a Profa. Dra. Ana Cristina Brito pelas valiosas contribuições a este trabalho.

À Profa Cristina Normande, pela amizade, incentivo e pela oportunidade inicial dispensada na minha formação, essencial ao meu desenvolvimento profissional.

À Profa Eneida Lipinski, educadora e formadora de educadores;

À Amiga Bióloga Maria Raphaella Vasconcelos, pessoa que compartilhou toda esta caminhada, com reta intenção conseguimos vencer esta batalha, agradeço por sua amizade;

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, em especial às Biólogas Adriana Domarques Menezes e Elane Pereira, pela amizade e responsabilidade com que auxiliaram na execução deste trabalho;

Aos meliponicultores Bérqson, Natalício, Teobaldo, Delmo, Júlio César, Mário, Roseane, Val, Sebastião, pessoas que contribuem para viabilização deste trabalho, com seus ensinamentos de campo, sabedoria e amostras de méis;

Aos Apicultores Pedro Acioli de Souza, Ronald Barbosa Coutinho, Lucas Pereira Martins e Salatiel Silva, pela contribuição na coleta das amostras de mel;

À advogada Eliana Beserra pela habilidade profissional que nos auxiliou a garantir um direito adquirido, reparando uma injustiça, nessa caminhada acadêmica.

À Zootecnista Entomóloga Dra. Daniela Anacleto, pelo auxílio na confirmação das espécies de abelhas nativas;

Aos amigos que contribuíram direta ou indiretamente nesta fase profissional de minha vida.

RESUMO

A criação racional de abelhas é uma das atividades agropecuárias mais promissoras, visto que é essencialmente familiar e auto-sustentável, pois auxilia na manutenção e recuperação do meio ambiente através de seu papel na polinização e garante renda ao produtor que emprega nela a sua família. O mel é o principal produto dessa atividade, sendo gerado por abelhas melíferas - nativas ou africanizadas. Sua composição química é bastante variada, dependendo principalmente da origem floral, entomológica e geográfica. O propósito deste trabalho foi avaliar qualidade do mel de diferentes origens entomológicas do Estado de Alagoas, na estação das secas de 2008/09, por meio de parâmetros físico-químicos e microbiológicos, além de conhecer suas prováveis ações antioxidante e antimicrobiana. Para tanto, coletou-se 43 amostras de méis (14 de *Apis mellifera*, 22 de *M. scutellaris*, 03 de *M. quadrifasciata*, 02 de *M. subnitida* e 02 de *Plebeia* sp.) em diferentes municípios alagoanos. Em relação aos parâmetros físico-químicos, avaliou-se o conteúdo de glicídios redutores, glicídios totais, sacarose aparente, umidade, condutividade elétrica, pH, acidez, teor de proteínas totais, concentração de prolina, hidroximetilfurfural e atividade diastásica. Em relação à atividade antioxidante avaliou-se quantitativamente e qualitativamente o conteúdo de fenóis e flavonóides totais, captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), além do método de redução do $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ (método FRAP). Avaliou-se, ainda, a segurança microbiológica dos méis através da detecção de esporos de *Clostridium* sp., além do perfil antibacteriano e antifúngico dos diferentes méis. Foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal Wallis* a 95 % de probabilidade ($p < 0,05$), pois os dados não apresentaram distribuição normal, realizando-se, ainda, a correlação de *Spearman* a 95 % de significância, $p < 0,05$ e 99% de significância, $p < 0,01$. No tocante aos parâmetros físico-químicos, apenas condutividade elétrica e sacarose não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os méis das distintas espécies de abelhas. Em relação à atividade antioxidante, os méis de *A. mellifera* apresentaram ação superior do que os das nativas, exceto no caso dos méis de *Plebeia* sp., que se destacaram em uma série de parâmetros em comparação com o das demais abelhas nativas. Verificou-se, ainda, que os méis de abelhas nativas apresentaram maior atividade antimicrobiana em relação aos méis de *A. mellifera*. Portanto, a ação antibacteriana provavelmente se deve ao efeito sinérgico da alta concentração de íons H^+ (baixo pH), glicídios (potencial osmótico) e compostos fenólicos que se ligam às unidades glicídicas formadoras de sua parede celular, inviabilizando sua adequada proliferação.

PALAVRAS-CHAVE: Mel de abelhas, Meliponicultura, Parâmetros Físico-Químicos, Atividade Antioxidante, Atividade Antimicrobiana, *Clostridium* sp, *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp.

ABSTRACT

The rational development of bees is one of the most promising agricultural activities, since it is essentially self-sustaining family and therefore helps to maintain and restore the environment, through their role in pollination, and guarantee income to the producer who employs his family on it. Honey is the main product of this activity, being generated by honey bees - native or Africanized. Its chemical composition is quite varied, depending mainly of floral, entomological and geographical origin. The purpose of this study was to evaluate the quality of honey from different entomologic sources of the State of Alagoas, in the dry season of 2008/09, by physico-chemical and microbiological criteria, and know their likely actions antioxidant and antimicrobial. Thus, 43 samples of honey (14 of *Apis mellifera*, 22 of *M. scutellaris*, 3 of *M. quadrifasciata*, 2 of *M. subnitida* e 2 of *Plebeia* sp) were collected from different municipalities of Alagoas. In relation to the physico-chemical parameters, it were evaluated the content of reducing carbohydrates, total carbohydrates, sucrose apparent, moisture, electrical conductivity, pH, acidity, content of total protein, concentration of proline, diastase activity and hydroxymethylfurfural. Regarding to the antioxidant activity, it was evaluated in qualitative and quantitative terms of the content of total phenols and flavonoids, capture of the radical 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazil (DPPH) and through the antioxidant power of reduction of $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ (FRAP method). It was also evaluated the microbiological safety of honeys through the detection of spores of *Clostridium* sp., and through the profile of various antimicrobial. We used the nonparametric test of *Kruskal Wallis* to 95% ($p < 0.05$), because the data did not show normal distribution. It was also performed the correlation of *Spearman* to 95% significance, $p < 0.05$, and 99% significance, $p < 0.01$. With regard to the physico-chemical parameters, only electrical conductivity and sucrose showed no statistically significant difference ($p < 0.05$) among the different species of honey bees. On the antioxidant activity, the honey of *A. mellifera* showed higher activity than those of natives, except in the case of honey of *Plebeia* sp, who stood out in a number of parameters compared to the other native bees. It was found also that the honey of native bees showed slight difference in comparizon to the honeys of *A. mellifera* regarding to its antimicrobial action, and it was not seen this variation on the activity of heat-resistant fungi, which were also much less sensitive than the bacteria to aqueous solutions of honey (25%). Therefore, the antibacterial action is probably due to the synergistic effect of high concentration of H^+ ions (low pH), carbohydrates (osmotic potential) and phenolic compounds that bind to glucose forming units of its cell wall, preventing their proper proliferation.

KEYWORDS: Honey of bee, Meliponiculture, Physico-Chemical Parameters, Antioxidant Activity, Antimicrobial Activity, *Clostridium* sp. *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Abelhas da espécie <i>Apis mellifera</i> em um quadro de mel.....	6
FIGURA 2 – Distribuição de algumas espécies de abelhas sem ferrão (nome popular) nas diferentes regiões do Brasil.....	8
FIGURA 3 – Aspecto da arquitetura da entrada do ninho de <i>Melipona scutellaris</i> , com uma abelha guarda na entrada da colméia, evidenciando a estratégia de defesa.....	10
FIGURA 4 – Aspecto da forma de criação de <i>Melipona scutellaris</i> (Uruçu) em troncos de árvores capturados da natureza.....	11
FIGURA 5 – Desidratação (simplificada) de ceto-hexoses formando hidroximetilfurfural (HMF).....	26
FIGURA 6 – Sequestro do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidante.....	28
FIGURA 7 - Estrutura do fenol (sinonímia: ácido carbólico, ácido fênico, hidróxi-benzeno, ou hidróxi-fenil) o mais simples dos compostos fenólicos.....	29
FIGURA 8 – Exemplos de ácidos fenólicos presentes em mel, pólen e própolis.....	30
FIGURA 9 – a) Estrutura química típica dos flavonóides [composta por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)]; b) alguns flavonóides agliconas.....	31
FIGURA 10 – Flavonóides encontrados em mel e outros produtos apícolas.....	32
FIGURA 11 - Algumas flavanas encontradas em mel, própolis e pólen apícola.....	33
FIGURA 12 – Mesorregiões Apícolas do Estado de Alagoas. 1 – Litoral; 2 – Região canavieira; 3 – Mata Atlântica; 4 – Agreste; 5 – Baixo São Francisco; 6 – Semi-Árido...	38

FIGURA 13 – Mapa ilustrativo dos municípios onde foram realizadas as coletas das amostras de méis de abelhas nativas [em verde 1-6; AU: Uruçú (<i>M. scutellaris</i>), AM: Mandaçaia (<i>M. quadrifasciata</i>), AJ: Jandaíra (<i>M. subnitida</i>), AP: Plebéia (<i>Plebeia</i> sp)] e africanizadas (em preto 7-9, M: <i>Apis mellifera</i>), representativos de diferentes mesorregiões apícolas do Estado de Alagoas.....	39
FIGURA 14 – Aspecto da criação de <i>Melipona scutellaris</i> (uruçu) em tronco de árvores capturados da natureza, nos municípios alagoanos de: a) Ibateguara (região canavieira); b) Palmeira dos Índios (agreste).....	40
FIGURA 15 – Aspecto da criação de <i>Melipona scutellaris</i> (uruçu) em caixas de cultivo racional, no Município de Barra de Santo Antônio (litoral de Alagoas).....	40
FIGURA 16 – Aspecto da criação de meliponíneos (<i>M. quadrifasciata</i> ; <i>M. subnitida</i> e <i>Plebeia</i> sp) acondicionados em caixas racionais de cultivo no município alagoano de Delmiro Gouveia (sertão, região do São Francisco).....	41
FIGURA 17 – Ninho de <i>Melipona scutellaris</i> (abelha Uruçú) em oco de tronco (a) e formato dos potes de mel armazenado (b), em meliponário do município de Palmeira dos Índios (agreste alagoano).....	41
FIGURA 18 – Ninho de <i>Melipona quadrifasciata</i> (abelha mandaçaia) em caixa padrão (a) e estrutura do ninho (b) em meliponário do município alagoano de Delmiro Gouveia (sertão, região do São Francisco).	42
FIGURA 19 – Colônia de <i>M. scutellaris</i> , (a) e (b) e coleta de mel com auxílio de seringa esterilizada descartável no município alagoano de Palmeira dos Índios (agreste).....	42
FIGURA 20 – Apiário experimental instalado no município de Barra de São Miguel – AL.....	43
FIGURA 21 – Inoculação da diluição de mel em água peptonada (0,1%) no meio de cultura <i>Cooked Meat Medium</i> (CMM).....	51

FIGURA 22 – Inoculação da suspensão de microrganismos nas galerias do sistema API para sua identificação através das respostas bioquímicas.....	52
FIGURA 23 – Precipitação climatológica média observada e histórica acumulada, nas mesorregiões do Estado de Alagoas, nos meses de Janeiro a Dezembro de 2008. S: Sertão; SSF: Sertão do São Francisco; A: Agreste; BSF: Baixo São Francisco; ZM: Zona da Mata; e L: Litoral.....	55
FIGURA 24 – Perfil cromatográfico em camada delgada (sílica gel 60) de proteínas totais de mel de <i>A. mellifera</i> e de abelhas nativas do Estado de Alagoas (estação seca de 2008/09), <i>in natura</i> ou extraídas (por acetona a -20°C ou por suave precipitação com HCl- clorofórmio-metanol), e reveladas por ninhidrina e aquecimento a 105° por 5 min. M4-6: <i>A. mellifera</i> ; AP: <i>Plebeia</i> sp.....	67
FIGURA 25 – Perfil cromatográfico em camada delgada (sílica gel 60) de proteínas totais de mel de <i>A. mellifera</i> e de abelhas nativas do Estado de Alagoas (estação seca de 2008/09), obtidas por suave precipitação com HCl-clorofórmio-metanol, e reveladas por ninhidrina e aquecimento a 105° por 5 min. P= padrão de prolina; M3-8: <i>A. mellifera</i> ; AU5-12: <i>M. scutellaris</i> ; AJ1: <i>M. subnitida</i> AP1: <i>Plebeia</i> sp; AM1: <i>M. quadrifasciata</i>	67
FIGURA 26 – Perfil cromatográfico em camada delgada (sílica gel 60) de aminoácidos livres de mel de <i>A. mellifera</i> e de abelhas nativas do Estado de Alagoas (estação seca de 2008/09), a partir de extrato aquoso de méis hidrolisados com ácido fórmico (revelação ninhidrina e aquecimento 105°C). P= prolina; G= glicina; A= arginina; M3-8: <i>A. mellifera</i> ; AU4: <i>M. scutellaris</i> ; AJ1: <i>M. subnitida</i> AP1: <i>Plebeia</i> sp.....	70
FIGURA 27 - Perfil cromatográfico em camada delgada (sílica gel 60) de aminoácidos livres de mel de <i>A. mellifera</i> e de abelhas nativas do Estado de Alagoas (estação seca de 2008/09), a partir de extrato aquoso de méis hidrolisados com ácido fórmico (revelação ninhidrina e aquecimento 105°C), bem como os padrões de aminoácidos de prolina (P), glicina (G) e arginina (A). M3-8: <i>A. mellifera</i> ; AU4: <i>M. scutellaris</i> ; AJ1: <i>M. subnitida</i> AP1: <i>Plebeia</i> sp.	70

FIGURA 28 – Variação de coloração de méis de diferentes origens entomológicas produzidos em Alagoas na estação de seca 2008/09. M5: *A. mellifera*; AU: *M. scutellaris*; AP2: *Plebeia* sp.; AM2: *M. quadrifasciata*. 73

FIGURA 29 – Conteúdo de fenóis totais [equivalentes mg de ácido gálico (AG). 100 g⁻¹] em méis de abelhas nativas e africanizadas produzidos em Alagoas na estação de seca 2008/09..... 74

FIGURA 30 – Conteúdo de flavonóides totais (equivalentes mg de quercetina. 100 g⁻¹) em méis de abelhas nativas e africanizadas produzidos em Alagoas na estação de seca 2008/09..... 75

FIGURA 31 – Perfil cromatográfico (CCD em sílica gel 60, F_{254 nm}) de antioxidantes de mel de abelhas nativas e africanizadas, coletado no Estado de Alagoas durante a estação seca de 2008/09. As bandas foram intensificadas com vapor de amônia e observadas sob luz visível. Q: Quercetina; AG: Ácido Gálico; C: Catequina; AT: Ácido Tânico; AS: Ácido Salicílico; M3-8: mel de *A. mellifera*; AP1: mel de *Plebeia* sp; AU12: mel de *M. scutellaris*..... 79

FIGURA 32 – Perfil cromatográfico (CCD em sílica gel 60, F_{254 nm}) de antioxidantes de mel de abelhas nativas, coletado no Estado de Alagoas durante a estação seca de 2008/09. As bandas foram reveladas com solução metanólica de DPPH (0,2%) e observadas sob luz visível. Q: Quercetina; AG: Ácido Gálico; AU16-21: mel de *M. scutellaris*; AM2-3: mel de *M. quadrifasciata*; AJ2: mel de *M. subnitida*; AP2: mel de *Plebeia* sp..... 79

FIGURA 33 – Perfil cromatográfico (CCD em sílica gel 60, F_{254 nm}) de antioxidantes de mel de abelhas africanizadas e nativas, coletado no Estado de Alagoas durante a estação seca de 2008/09. As bandas foram reveladas com: **a)** solução alcoólica de AlCl₃ (10%); **b)** metanólica de DPPH (0,2%), e observadas sob luz visível. Q: Quercetina; AG: Ácido Gálico; M3-8: *A. mellifera*; AU16-12: mel de *M. scutellaris*; AM2-3: mel de *M. quadrifasciata*; AJ1: mel de *M. subnitida*; AP1: mel de *Plebeia* sp..... 80

FIGURA 34 – Conteúdo de antioxidantes [equivalentes mg de ácido gálico (AG). 100 g ⁻¹] pelo método FRAP, em mel de abelhas nativas e africanizadas coletados no Estado de Alagoas durante a estação seca de 2008/09.....	81
FIGURA 35 – Turvação do meio de cultivo CMM, inoculado com amostras de mel de abelhas nativas (AJ1, AU15, AU17) e africanizadas (M3, M9), coletadas no Estado de Alagoas, durante a estação de seca 2008/09.....	84
FIGURA 36 – Aspecto morfológico do bacilo Gram positivo com endósporo terminal e subterminal isolado de amostras de mel de abelha nativa coletada no Estado de Alagoas na estação seca de 2008/09.....	84
FIGURA 37 – Aspecto dos resultados dos testes bioquímicos nos sistemas rápido API 20E a) controle; b) teste e API-Staph (c) (Biomerieux), inoculados com a amostra AU15 de mel de abelhas nativas coletado no Estado de Alagoas, durante a estação seca de 2008/09, 24 h após incubação a 37 °C, ao abrigo da luz.....	86
FIGURA 38 – Halo de inibição de crescimento de <i>S. Tiphymurium</i> e <i>E. coli</i> de soluções aquosas de mel (15 e 25%) de <i>Plebeia</i> sp. coletado em Delmiro Gouveia – AL na estação das secas 2008/2009.	90
FIGURA 39 – Aspecto do crescimento de <i>Neosartorya fischeri</i> (a) , <i>Talaromyces flavus</i> (b) e <i>Bysshoclamys fulva</i> (c) , incubados a 25 ± 1°C, ao abrigo da luz, durante 7 dias.....	93
FIGURA 40 – Inibição de <i>B. fulva</i> frente à solução aquosa de mel de <i>M. scutellaris</i> 50% A – Controle negativo, B – Inibição do <i>B. fulva</i> e diminuição do volume de micélio e aspecto de esporulação.....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros físico-químicos de mel de abelhas nativas e africanizadas.....	20
TABELA 2 – Municípios de coleta das amostras de mel (com códigos) de abelhas nativas e africanizadas, temperatura e índice pluviométrico dos mesmos na estação seca de 2008/09.....	56
TABELA 3 – Determinação de umidade (%), pH, acidez livre (meq. Kg ⁻¹), condutividade elétrica (mS. cm ⁻¹), proteínas totais (mg . 100g ⁻¹), prolina (mg . 100g ⁻¹), glicídios redutores, glicídios totais e sacarose (%), diastase (G), HMF (mg . Kg ⁻¹) e cor (mm Pfund) em mel de abelhas nativas e africanizadas de Alagoas na estação seca de 2008/09.....	57
TABELA 4 – Teste de Normalidade de <i>Kolmogorov-Smirnov</i> e <i>Shapiro-Wilk</i> , para as médias dos parâmetros físico-químicos avaliados em amostras de mel de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas na estação seca de 2008/09.	58
TABELA 5 – Teste de <i>Kruskal Wallis</i> para verificar se há diferença significativa entre as amostras de mel de abelhas nativas e africanizadas analisadas dentro de cada parâmetro (estação seca de 2008/09).....	59
TABELA 6 – <i>Ranking</i> (1-5) comparativo das médias estatisticamente diferentes entre si para cada parâmetro físico-químico entre os méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas (coletados durante a estação de seca 2008/09), segundo teste não paramétrico de <i>Kruskal Wallis</i> . Méis com números iguais a 1 não foram diferentes entre si, e a partir desse, as médias foram diferentes em ordem crescente.....	60
TABELA 7 – Coeficiente de correlação de <i>Spearman</i> entre os parâmetros físico-químicos de méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas, durante	

estação de seca 2008/09.....	61
TABELA 8 – Resultados dos testes bioquímicos do sistema API 20E e API-Staph (Biomerieux), inoculados com a amostra AU15 e AU17 de mel de abelhas nativas coletado no Estado de Alagoas, durante a estação seca de 2008/09, 24 h após incubação a 37 °C, ao abrigo da luz.....	85
TABELA 9 – Halo de inibição (Média de Diâmetro ± DP) de soluções aquosas de méis de <i>Apis mellifera</i> (M1-M14), colhidos na estação seca de 2008/09, no Estado de Alagoas, frente a microrganismos incubados por 24 h a 30 ± 1 °C (<i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> Typhimurium) ou a 37 °C (<i>H. pylori</i>) em meio AN.....	88
TABELA 10 – Halo de inibição (Média de Diâmetro ± DP) de soluções aquosas de méis de <i>Melipona scutellaris</i> (AU1-AU22), <i>M. quadrifasciata</i> (AM1-AM3), <i>M. subnitida</i> (AJ1-AJ2) e <i>Plebeia</i> sp (AP1-AP2), colhidos na estação seca de 2008/09, no Estado de Alagoas, frente a microrganismos incubados por 24 h a 30 ± 1 °C (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium) ou a 37 °C (<i>H. pylori</i>) em meio AN.....	89
TABELA 11 – Inibição de crescimento (%) dos fungos <i>Neosartorya fischeri</i> , <i>Talaromyces flavus</i> e <i>Bysschoclamys fulva</i> frente à solução aquosa de mel (50%) de abelhas <i>A. mellifera</i> , <i>M. scutellaris</i> , <i>M. quadrifasciata</i> , <i>M. subnitida</i> e <i>Plebeia</i> sp, coletadas na estação seca (2008/09) do Estado de Alagoas.....	94

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Principais espécies de abelhas sem ferrão do Brasil - localização geográfica e bioma de ocorrência.....	09
QUADRO 2 – Métodos complementares a avaliação polínica na determinação da origem botânica de mel.....	17
QUADRO 3 – Classificação do mel conforme a cor.....	49
QUADRO 4 – Resultados dos testes visando identificação de bastonetes de <i>Clostridium</i> sp ou <i>Bacillus</i> sp em amostras de mel de diferentes abelhas africanizadas e nativas coletadas no estado de Alagoas, durante a estação seca de 2008/09.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SIGLAS

ABTS – 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
AlCl₃ – Cloreto de Alumínio
AN – Ágar nutriente
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA – Área de Proteção Ambiental
AS – Ágar Saboraud
Al - Alumínio
BPF – Boas Práticas de Fabricação
[C₆H₄(CO₂H)(CO₂K)] - Biftalato de Potássio
C₄H₄KNaO₆ – Tartarato duplo de Sódio e de Potássio
Cu – Cobre
CBA – Confederação Brasileira de Apicultura
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CCT – Coleção de Culturas Tropicais
CG – Cromatografia Gasosa
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm – centímetro
CMM - *Cooked Meat Medium*
CO₂ – Gás carbônico
CuSO₄ - Sulfato de cobre
DPPH – Difenil-1-picril-hidrazil
Em – Espectrometria de Massa
Eq. mg – Equivalentes miligramas
ERN – Espécies reativas de nitrogênio
ERO - Espécies reativas de oxigênio
F/G – Frutose/Glicose
FANUT – Faculdade de Nutrição
FRAP – *Ferric reducing antioxidant power*
FeCl₃ – Cloreto Férrico
g – grama
GR – Glicídios redutores;
GT – Glicídios totais;
HCl – Ácido clorídrico
HMF – Hidroximetilfurfural
HNO₂ – Ácido nitroso
HO – Hidroxila
H₂O – Água
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHC – International Honey Commission
IQB – Instituto de Química e Biotecnologia
K₃Fe(CN)₆ – Ferricianeto de Potássio
Kcal.g⁻¹ – Quilocaloria por Grama
Kcal – Kilocaloria
Kg – Kilograma
LBPMA – Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental
Mg – Magnésio;

Mn – Manganês;
MAPA –Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
meq. Kg⁻¹ – miliequivalentes por kilogramas
mg – miligrama
µg – micrograma
µL – microlitro
nm – nanômetro
NaCl – Cloreto de Sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
NO₂ – Nitritos
NO₃ – Nitratos
N₂O₃ - Óxido nitroso
ONOO⁻ - Peroxinitritos
ORAC – Radical peroxila
RO – Alcoxila
ROO – Peroxila
rpm – rotação por minuto
R – Rutina
Rf – Fator de retenção
S – Sertão
SD – Desvio Padrão
SRHMA – Secretaria de Recursos Hídricos e do Meio Ambiente
Samr – *Staphylococcus aureus* metilicina resistente
ton – tonelada
UFAL – Universidade Federal de Alagoas
UFC – Unidade Formadora de Colônia
Zn – Zinco

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE QUADROS.....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIX
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS	3
3 – REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Apicultura: Aspectos Gerais.....	5
3.2. Meliponicultura: Aspectos Gerais.....	7
3.2.1. <i>Melipona scutellaris</i> Latreille.....	13
3.2.2. <i>Melipona quadrifasciata</i> Lep.....	13
3.2.3. <i>Melipona subnitida</i> Ducke.....	13
3.2.4. <i>Plebeia droryana</i> Friese.....	14
3.3. Mel.....	14
3.3.1. Análise Melissopalinológica.....	16
3.3.2. Qualidade Físico-Química De Mel.....	20
3.3.3. Atividade Antioxidante De Mel.	26

3.3.4. Atividade Antimicrobiana De Mel	33
3.3.5. Qualidade Microbiológica De Mel.....	36
4 – METODOLOGIA.....	38
4.1. Mesorregiões do Estado de Alagoas e Municípios em Estudo.....	38
4.2. Local de Análise das Amostras de Mel.....	43
4.3. Análises físico-químicas dos diferentes méis de abelhas.....	43
4.4. Perfil Antioxidante dos méis de diferentes abelhas.....	49
4.5. Detecção de esporos de <i>Clostridium</i> sp.....	51
4.6. Atividade antibacteriana dos diferentes méis de abelhas.....	53
4.7. Atividade Antifúngica dos méis de nativas e africanizadas.....	53
4.8. Delineamento Estatístico.....	54
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. Características Climáticas das Regiões de Coleta.....	55
5.2. Parâmetros Físico-químicos dos méis.....	56
5.3. Avaliação antioxidante de méis de abelhas nativas e africanizadas.....	73
5.4. Detecção de <i>Clostridium</i> sp.....	82
5.5. Atividade antibacteriana.....	87
5.6. Atividade Antifúngica.....	92
6 – CONCLUSÃO.....	96
7 – PERPECTIVAS E SUGESTÕES DE ESTUDOS.....	98

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
9 – APÊNDICE 1 - (Artigo submetido à Química Nova).....	117
9 – APÊNDICE 2 – Curvas Padrão.....	140

1. INTRODUÇÃO

Face à grande adaptabilidade das abelhas ao clima das diversas regiões onde se instalam, sua criação é uma atividade mundialmente conhecida (LENGLER, 2007), apresentando duas grandes linhas de estudo: a apicultura, que estuda produtos de abelhas africanizadas do gênero *Apis*, as quais foram introduzidas no Brasil (exóticas) durante o século XIX, e a meliponicultura, que se destina ao estudo de abelhas nativas, cujas principais espécies de ocorrência na região Nordeste são: *Melipona scutellaris* (Uruçu), *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Melipona subnitida* (Jandaíra) (LOCATELLI *et al.*, 2006).

A implantação de programas apícolas no Brasil é amplamente promissora, visto que em grande parte de sua extensão ocorre à cobertura vegetal (natural e diversificada, ou substituída por culturas agrícolas), além das condições edafoclimáticas serem favoráveis durante todo o ano para a criação de abelhas africanizadas - as quais apresentam vantagem competitiva no tocante à tolerância às pragas e doenças. A suscetibilidade às pragas e doenças, aliás, tem causado prejuízos em importantes regiões apícolas do mundo (ARRUDA *et al.* 2004; BERTOLDI *et al.* 2004).

O produto apícola mais fácil de ser explorado é o mel, sendo também o mais conhecido e aquele com maiores possibilidades de comercialização. Winston (2003) o define como o produto resultante do néctar levado dentro das vesículas melíferas das abelhas à colméia, e submetido a processos físicos (desidratação) e químicos (enzimáticos). Durante a coleta, enzimas das glândulas hipofaríngeas (α -amilase, invertase e glicose-oxidase) são acrescidas ao néctar e, quando as reações enzimáticas e a vaporização da água se completam, esse composto “maduro” é chamado de mel (CRANE, 1983).

A composição química do mel é bastante variada, dependendo principalmente da origem floral. No entanto, a origem entomológica deste alimento exerce papel fundamental em sua composição química, visto que diferentes espécies de abelhas possuem hábitos de visitação floral distintos (SILVA *et al.*, 2004; ZAMORA & CHIRIFI, 2006; ALMEIDA-ANACLETO, 2007).

O mel de abelhas sem ferrão (nativas), por outro lado, é um produto que também

DUARTE, A. W. F. 2009. *Mel de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas: composição química, segurança microbiológica e atividade terapêutica.*

tem apresentado uma demanda crescente de mercado em diferentes regiões do Brasil, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis*. Entretanto, ainda existem poucos estudos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e nutracêuticas desse produto, dificultando assim a definição de padrões de qualidade para a sua comercialização (NOGUEIRA-NETO, 1997; SOUZA *et al.*, 2004; ALMEIDA-ANACLETO, 2007; SOUZA, 2008).

Diante do exposto, o propósito deste trabalho foi avaliar a qualidade do mel de diferentes origens entomológicas de municípios representativos de diferentes mesorregiões do Estado de Alagoas, na estação das secas, por meio de parâmetros físico-químicos e microbiológicos, além de conhecer sua atividade antioxidante e antimicrobiana.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Diferenciar, segundo sua composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana, os méis de abelhas nativas e africanizadas de diferentes regiões do Estado de Alagoas, produzidos durante a estação das secas.

2.2 ESPECÍFICOS:

2.2.1 – Caracterizar a qualidade físico-química dos méis de abelhas nativas e africanizadas, por meio dos seguintes parâmetros: glicídios redutores, glicídios totais, sacarose aparente, condutividade elétrica, umidade, pH, acidez, teor de proteínas, conteúdo de prolina, hidroximetilfurfural e atividade diastásica;

2.2.2 – Determinar os conteúdos de fenóis e flavonóides totais nos diferentes méis, além de avaliá-los qualitativamente (Cromatografia em Camada Delgada);

2.2.3 – Avaliar a capacidade antioxidante dos diferentes méis, por meio do teste de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), além do método de redução do $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ (método FRAP);

2.2.4 – Diagnosticar a segurança microbiológica dos méis, por meio da detecção de esporos de *Clostridium* sp.

2.2.5 – Avaliar o perfil antibacteriano dos méis de *A. mellifera* e de abelhas nativas frente a bactérias de interesse em gastroenterites alimentares, a saber, *Salmonella* Tiphymurium, *Escherichia coli* além de *Helicobacter pylori*;

2.2.6 – Determinar a atividade antifúngica dos méis de nativas e africanizadas frente a fungos filamentosos termorresistentes e deteriorantes de alimentos *Byssoschlamys fulva* (CCT 0056), *Neosartorya fischeri* (CCT 3491) e *Talaromyces flavus* (CCT 4683);

2.2.7 – Relacionar os parâmetros físico-químicos e atividade antioxidante através de métodos estatísticos com a origem entomológica dos diferentes méis.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Insetos da ordem Hymenoptera, as abelhas surgiram no planeta há mais de 50 milhões de anos e sua criação é uma atividade mundialmente conhecida. Praticamente todas as civilizações conheceram e utilizaram seus produtos para diferentes fins, alimentícios e/ou medicinais, como o uso do mel em tratamento de feridas, queimaduras, tratamento de catarata, desordens e lesões agudas e crônicas do trato gastrointestinal (AL-MAMARY *et al.*, 2002; BALTRUSAITYTE *et al.*, 2007; LENGLER, 2007). Tais usos, no entanto, foram baseados em princípios empíricos por muito tempo, mas atualmente são requeridos estudos de atividades biológicas para determinação das propriedades terapêuticas do mel (BERETTA *et al.*, 2005; KUÇUK *et al.*, 2007; AL *et al.*, 2009).

O homem dos primórdios empreendia verdadeiras aventuras para saborear o mel das colméias, sem compreender que as ferroadas das abelhas serviriam de medicamento para resolver problemas reumáticos e artríticos. Há 6.000 anos, os hindus já conheciam o fato de que, além do mel que usavam como alimento, a própolis, tinha efeito cicatrizante de feridas. Papiros egípcios escritos há 4000 anos também apresentavam relatos de sucesso no tratamento de 48 casos em que se utilizou uma mistura de cera e mel sobre cortes abertos, além de gargarejos de mel e anis para úlceras bucais. O “pai da Medicina”, o grego Hipócrates (460-370 a.C.), também usava esse alimento em seus preparados para combater diversas doenças (LENGLER, 2007).

Aproximadamente 1.200.000 toneladas (ton) de mel são produzidas no mundo anualmente, sendo a China o maior produtor (cerca de 260 mil ton ao ano). A Alemanha é o principal importador, consumindo cerca de 50% do mel exportado no mundo, e produzindo menos de 33 mil ton ao ano. No Japão, 60% do mel são empregados na indústria e 40% constituem mel de mesa, sendo esse país um dos maiores importadores do produto, em vista da redução do número de apicultores por conta dos melhores preços de importação, e da diminuição de áreas melíferas. A Argentina, que produz cerca de 60 mil ton ao ano, consome somente cerca de 10 ton ao ano desse produto (EMBRAPA, 2006; SOUZA, 2006b).

A maioria dos brasileiros que consome mel pertence às classes A e B, e o faz na forma de medicamento, não o considerando um produto oneroso. Por outro lado, aqueles que consideram o mel um alimento, acreditam no mito de que este aumente as taxas de colesterol, além de que, para tal clientela é um produto caro (SEBRAE

AGRONEGÓCIOS, 2006). A média de consumo per capita nacional por ano é de 100 g de mel, enquanto que o europeu consome em torno de 1 Kg (PEROSA, 2004).

Conforme dados da Confederação Brasileira de Apicultura, em 2007 o Brasil foi o 11º produtor de mel no *ranking* mundial, sendo que a cadeia produtiva envolvia mais de 350 mil apicultores, além de gerar 450 mil ocupações no campo e 16 mil empregos diretos no setor industrial. O país também conquistou posição de destaque no mercado externo, sendo o 5º maior exportador, passando de 269 toneladas de mel exportadas em 2000, para 21 mil toneladas em 2005. Nos primeiros 9 meses de 2007, as exportações brasileiras de mel totalizaram uma receita de US\$ 15.872.540,00 sobre um volume de 6.869.676,00 Kg, sendo os seis principais Estados exportadores nesse período os de São Paulo (US\$ 5.749.375,00); Rio Grande do Sul (US\$ 2.402.763,00); Santa Catarina (US\$ 2.031.888,00); Ceará (US\$ 1.934.544,00); Piauí (US\$ 1.682.448,00) e Paraná (US\$ 1.094.231,00) (RESENDE, 2008).

Portanto, no Brasil, a apicultura vem crescendo anualmente devido às condições edafoclimáticas favoráveis, especialmente na região Nordeste e representa uma alternativa de renda ao sertanejo por requerer baixo investimento financeiro e ocupação da mão de obra familiar (ARRUDA *et al.*, 2004; BERTOLDI *et al.*, 2004).

3.1 APICULTURA: ASPECTOS GERAIS

As abelhas pertencem à Superfamília Apoidea da Ordem Hymenoptera, sendo que aquelas com hábitos sociais são classificadas dentro da subfamília Apinae, contendo esta várias tribos (WINSTON, 2003). Dentre as que possuem hábitos sociais mais avançados, a tribo Apini agrupa as abelhas do gênero *Apis*, e a tribo Meliponini agrega as abelhas sem ferrão ou meliponíneos (NOGUEIRA-NETO, 1997; LOCATELLI *et al.*, 2006).

A tribo Apini é representada pela espécie *Apis mellifera*, a qual foi introduzida no Brasil em 1839, pelo Padre Antônio Carneiro, em colônias alemãs, italianas e caucasianas, quando vinha Porto, em Portugal (NOGUEIRA-NETO, 1997). Em 1956, as abelhas africanas (*A. mellifera scutellata*), conhecidas como altamente produtivas, porém agressivas, foram introduzidas em Camaquã na região de Rio Claro-SP, pelo Prof. Warwick Estevam Kerr, com o objetivo de efetivar o melhoramento genético das abelhas trazidas pelo Padre Antônio Carneiro e imigrantes, aumentando sua produção de mel, associado a uma baixa agressividade (SOARES, 2006). Das colônias de abelhas africanas, 26 fugiram por acidente, devido à fácil adaptação dessas ao clima tropical brasileiro,

similar ao do continente africano. Essas enxamearam e cruzaram com as européias que aqui existiam, e 20 anos após já tinham se expandido por toda a América do Sul, na forma de híbridos entre as abelhas alemãs (*A. mellifera mellifera*), italianas (*A. mellifera linguistica*), caucasianas (*A. mellifera caucasica*) e africanas. Já que os híbridos apresentaram características mais próximas às das abelhas africanas, foram denominados "africanizados" (Figura 1) (WIESE, 1985; NOGUEIRA-NETO, 1997; WINSTON, 2003; MENDONÇA & LIRA, 2006).



FIGURA 1 – Abelhas da espécie *Apis mellifera* em um quadro de mel.

Assim, a criação racional de abelhas do gênero *Apis* (Apicultura) é atualmente desenvolvida em todo o Brasil com abelhas africanizadas, que apresentam produtividade superior, maior resistência a doenças e melhor adaptação às condições climáticas de todo o território brasileiro. Este é ocupado por cobertura vegetal natural diversificada, ou substituída por culturas agrícolas (WINSTON, 2003; ARRUDA, *et al.*, 2004; BERTOLDI *et al.*, 2004; WIESE, 2005).

Floradas variadas, clima quente e maior período de luminosidade são trunfos do Nordeste brasileiro para incremento de sua apicultura, gerando empregos, melhoria sócio-econômica das populações de baixo poder aquisitivo, e aumento da balança comercial por meio de exportação (LIMA, 1995). Cerca de 50% da vegetação do Nordeste é composta por caatinga hiperxerófila, com trechos de Floresta Caducifólia, sendo a exploração agrícola, bastante dificultada pelo homem. Por outro lado, é uma região promissora para o desenvolvimento de grandes projetos apícolas, uma vez que apresenta um pasto apícola

praticamente sem qualquer contaminação química, com possibilidade de obter o mel orgânico, livre de agrotóxicos e medicamentos (ARRUDA *et al.*, 2004).

Segundo Souza (2006b), a apicultura vem sendo praticada em Alagoas desde o final da década de 80 e início da década de 90, sendo inicialmente desenvolvida de forma artesanal, já que no Estado não havia empresas que comercializavam insumos, equipamentos e ferramentas apícolas, não atendendo aos padrões recomendados pela tecnologia empregada no setor. Além disso, a produção apícola do Estado é uma atividade secundária, caracterizada por pequenos apiários fixos, baixo manejo dos enxames, desconhecimento da flora apícola, falta de controle de qualidade do produto, logística de vendas deficiente e cooperativismo incipiente (NETO, 2008). Portanto, a apicultura do Estado de Alagoas carece de formalidade e profissionalização (SOUZA, 2006b; NETO, 2008).

Estima-se que o Estado de Alagoas possua cerca de 700 apicultores, Segundo o IBGE, em 2001, Alagoas produziu 21.200 Kg de mel, em 2004 aumentou essa produção para 116.098 Kg, e em 2007 para 171,85 Kg. Vários produtos apícolas, entretanto, possuem potencial significativo de comercialização e conseqüentes benefícios para o Estado, seja através da geração de renda direta para trabalhadores rurais e produtores de insumos, ou seja através da recuperação de áreas degradadas por erosão, queimadas e desmatamentos, e da própria produção agrícola, em face do desempenho das abelhas na polinização. No entanto, a distância entre o potencial produtivo e a produção do Estado é notória (PLANO DE AÇÃO APL APICULTURA NO SERTÃO, 2004; NETO, 2008).

3.2 MELIPONICULTURA: ASPECTOS GERAIS

As abelhas nativas (meliponíneos dos trópicos de todos os continentes) somam cerca de 56 gêneros e 600 espécies (SOUZA *et al.*, 2006). A meliponicultura (termo utilizado pela primeira vez por Paulo Nogueira-Neto, em 1953) é o nome dado à criação de abelhas sem ferrão, pois embora presente, o ferrão destas abelhas é atrofiado, (NOGUEIRA-NETO, 1997). As abelhas sem ferrão são amplamente distribuídas nas regiões de clima tropical do planeta, ocupando também algumas regiões de clima temperado subtropical (KERR *et al.*, 1996).

Tais abelhas pertencem à superfamília Apoidea, família Apidae, subfamílias Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. Os Meliponinae, por sua vez, se dividem em duas tribos: Meliponini e Trigonini (NOGUEIRA-NETO, 1997). A tribo Meliponini é dividida em duas subtribos: Meliponina, representada apenas pelo gênero *Melipona*, e

Trigonina, que é constituída por vários gêneros (VIT *et al.*, 2004).

As colônias de *Melipona* possuem entre 500 e 4000 indivíduos, enquanto que as de *Trigona* variam de 300 a 80.000 abelhas (FREITAS, 2003).

Os principais gêneros de abelhas melíferas nativas são: *Melipona*, *Tetragonisca*, *Scaptotrigona*, *Plebeia* (na América), *Meliponula* (África), *Tetragonula* (Ásia) (SOUZA *et al.*, 2006). Dentre os países que se destacam nas Américas pela criação de abelhas nativas estão México, Colômbia, Guatemala, Venezuela e Brasil (VIT *et al.*, 2004).

Segundo Kerr *et al.* (1996), os povos pré-colombianos já conheciam as abelhas sem ferrão e as domesticaram, dando-lhes os nomes que ainda hoje persistem na cultura popular brasileira: Jataí, Uruçu, Tiúba, Mombuca, Jandaíra, Guarupu, Manduri e tantas outras.

Como a diversidade de espécies de meliponíneos no Brasil é grande (Figura 2, Quadro 1), freqüentemente encontra-se mais de uma espécie com o mesmo nome popular. Assim é que denominações como Mirim, Mosquito, Jandaíra, Mandaçaia e Uruçu são comuns em todo o país, mas a espécie de abelha a que se referem é diferente entre regiões, Estados ou ainda em uma mesma localidade (NOGUEIRA-NETO, 1997). A nomenclatura científica torna-se, portanto, a única referência segura para sabermos com que espécie de abelhas sem ferrão se está lidando (FREITAS, 2003).



FIGURA 2 – Distribuição de algumas espécies de abelhas sem ferrão (nome popular) nas diferentes regiões do Brasil. Fonte: LOPES *et al.* (2005).

QUADRO 1 – Principais espécies de abelhas sem ferrão do Brasil - localização geográfica e bioma de ocorrência.

Espécie de Abelha sem ferrão	Bioma e Localização Geográfica
<i>Melipona compressipes manaoensis</i> ; <i>M. seminigra merrillae</i> Cockerell; <i>M. rufiventris paraensis</i> Ducke;	Amazônia (Amazonas)
<i>Frieseomellita</i> sp.; <i>M. compressipes fasciculata</i> Smith; <i>M. compressipes manaoensis</i> ; <i>M. rufiventris flavolineata</i> Friese; <i>M. melanoventer</i> Schwarz; <i>M. seminigra pernigra</i> Moure & Kerr; <i>M. seminigra</i> Moure & Kerr (Tapajós subsp.); <i>Scaptotrigona nigrohirta</i> Moure ; <i>Tetragona clavipes</i> Fabricius; <i>Tetragonisca angustula</i> Latreille;	Amazônia (Pará e Maranhão)
<i>M. crinita</i> Moure & Kerr; <i>M. eburnea fuscopilosa</i> Moure & Kerr; <i>M. flavolineata</i> Friese; <i>M. grandis</i> Guérin-Méneville; <i>Tetragonisca weyrauchi</i> Schwarz;	Amazônia (Acre)
<i>M. compressipes fasciculata</i> Smith; <i>M. fulva</i> Lepeletier;	Amazônia (Amapá)
<i>M. asilvai</i> Moure; <i>Scaptotrigona</i> sp.; <i>M. subnitida</i> Ducke;	Caatinga (Nordeste)
<i>M. rufiventris</i> Ducke; <i>M. scutellaris</i> Latreille; <i>M. quadrifasciata</i> Lep.; <i>Tetragonisca angustula</i> Latreille;	Mata Atlântica (Nordeste e Sudeste)
<i>Frieseomelitta varia</i> Lepeletier; <i>M. rufiventris</i> Ducke; <i>Scaptotrigona</i> sp.; <i>M. mandacaia</i> Smith.	Savana (Nordeste)

Fonte: Adaptado de CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006.

Apesar de não possuírem ferrão ativo, os meliponíneos desenvolveram estratégias para se defenderem de inimigos, variando estas com a espécie, o predador e o ecossistema em que vivem. Algumas espécies, como a Uruçu (*M. scutellaris* Latreille), a Jandaíra do Ceará (*M. subnitida* Ducke), e a Canudo ou Tubuna (*Scaptotrigona bipunctata* Holmberg), constroem entradas estreitas para o ninho, de forma que apenas uma ou poucas abelhas possam entrar de cada vez, e alinham abelhas-guarda na passagem (Figura 3). Isso evita

ataques dos inimigos. Outras espécies fecham essa entrada com cera e resina quando se sentem ameaçadas e só reabrem a entrada quando o perigo já se extinguiu (Uruçu Amarela: *M. rufiventris* Lepeletier e Uruçu Boca de Renda: *M. seminigra* Friese) (NOGUEIRA-NETO, 1997; FREITAS, 2003).



FIGURA 3 – Aspecto da arquitetura da entrada do ninho de *Melipona scutellaris*, com uma abelha guarda na entrada da colméia, evidenciando a estratégia de defesa.

A forma mais conhecida de defesa é aquela na qual a abelha enrola-se nos pêlos e/ou cabelos do agressor, aderindo própolis e mordendo-o, como fazem a Sanharão (*Trigona truculenta* Almeida) e a Arapuá ou Irapuá (*T. spinipes* Fabricius). Já a abelha Tataíra (*Oxytrigona tataíra* Smith) libera ácido fórmico produzido em suas glândulas mandibulares ao morder o inimigo, este queima a parte do corpo atingida (FREITAS, 2003).

Muitos meliponíneos constroem seus ninhos em cavidades de árvores (Figura 4), bambus e outras plantas, embora algumas espécies nidifiquem em fendas de rochas e orifícios decorrentes de ninhos abandonados de cupins ou formigas, de raízes que apodreceram ou, ainda, de frestas em assoalhos de madeira, paredes, calçadas, lajes e pilastras de cimento. No entanto, para criação racional e produção de mel de abelhas nativas, é necessário o uso de colméias apropriadas, visando a maximização da produção (KERR *et al.*, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997).

De uma maneira geral, o ninho dos meliponíneos é construído com uma mistura de cera, própolis e barro denominada cerume, e consiste basicamente das células de cria e

potes para armazenamento de pólen e mel. As células de cria apresentam-se quase sempre envoltas por uma fina membrana de cera e/ou resinas chamada invólucro e podem estar arranjadas em camadas horizontais chatas e sobrepostas, espiraladas ou em cachos. Portanto, as células de cria ficam na posição vertical e a abertura é na parte superior (FREITAS, 2003).



FIGURA 4 – Aspecto da forma de criação de *Melipona scutellaris* (Uruçu) em troncos de árvores capturados da natureza.

Os vários favos horizontais ou cachos de células da área de cria, bem como os pots de mel e pólen, são mantidos afastados e ao mesmo tempo interligados por uma série de pilares que dão firmeza e estrutura aos ninhos dos meliponíneos. A área total do ninho é demarcada por uma camada externa dura de batume (mistura de própolis e barro). As espécies que nidificam em locais abertos, como galhos de árvore, também adicionam resinas vegetais à camada externa do ninho para dar-lhe maior rigidez e proteção contra inimigos e intempéries (FREITAS, 2003; SOUZA, 2008).

O armazenamento do alimento das abelhas ocorre em células de cera construídas com essa finalidade, com aparência de pequenos pots redondos ou ovais (no caso de mel), ou, ainda, em forma de tubos de 3 a 15 cm de comprimento (no caso de pólen), dependendo da espécie. Mel e pólen, geralmente, são armazenados em pots diferentes, mas há espécies que misturam os dois em um mesmo pote. Algumas espécies fazem seus pots de mel e pólen formando um círculo em volta dos favos de cria, mas a maioria das espécies de meliponíneos os constrói isolados da área de crias (FREITAS, 2003).

Do ponto de vista biológico, a criação de abelhas nativas é importante porque, ao

coletarem pólen e néctar de flor em flor, esses insetos promovem a polinização de 40 a 90% da flora nativa, e conseqüentemente, asseguram a perpetuação de milhares de plantas nativas e das exóticas cultivadas favorecendo programas de reflorestamento (KERR *et al.*, 1996). Mas o interesse pela criação das mesmas, na maioria dos casos, é justificado pelo uso nutricional e terapêutico do mel e pelo fato da sua comercialização promover um aumento da renda familiar, além da atividade servir como fonte de lazer (CÁMARA *et al.*, 2004; CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006).

Apesar de essa atividade ser praticada há séculos, a exploração tem reduzido grandemente a população natural dessas espécies, havendo, no Brasil, muitas ameaçadas de extinção em conseqüência da alteração de seus ambientes em face do desmatamento, uso indiscriminado de agrotóxicos e ação predatória de meleiros (KERR *et al.*, 1996; PEREIRA, 2006; SOUZA *et al.*, 2006).

Como produzem uma quantidade de mel menor do que a de *A. mellifera*, o manejo racional de abelhas sem-ferrão não tem despertado o interesse de criadores, o que explica a limitada oferta desse produto. Conseqüentemente, em algumas regiões, como Sul e Sudeste, poucos conhecem os sabores do mel destas abelhas, o que faz do produto uma verdadeira iguaria, com cores, sabores e aromas incomparáveis. Os que reconhecem seu grande valor medicinal são geralmente as pessoas mais vividas (LOPES *et al.*, 2005). Apesar disso, no censo de 2005 sobre a meliponicultura brasileira, a região Nordeste foi a segunda colocada em termos de criadores (214) e ninhos (3182), ficando atrás apenas da região Sul, que possui 357 criadores e 6685 ninhos (LOCATELLI *et al.*, 2006).

Segundo Locatelli *et al.* (2006), dentre as espécies que mais ocorrem na região Nordeste, destacam-se Uruçu (*M. scutellaris*), com pelo menos 1064 ninhos, Mandaçaia (*M. quadrifasciata*), com 217 ninhos, Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille) com 104 ninhos, e Jandaíra (*M. subnitida*) com 889 ninhos.

Na Área de Proteção Ambiental (APA) de Santa Rita, região sul de Alagoas, estudos realizados por Silva & Lages (2001) constataram inúmeras zonas de relevante interesse ecológico, como a lagoa Manguaba e seus canais que a interligam com a lagoa Mundaú, além dos remanescentes de Mata Atlântica, restinga e manguezais. Este bioma, segundo os autores, comporta atividades comprovadamente não predatórias, como a meliponicultura, uma alternativa de renda extra ao morador ribeirinho. A pesquisa levantou a produção de mel de abelha Uruçu e conseqüente caracterização das práticas e técnicas envolvidas no manejo das colméias e extração de mel, confrontando-as com formas de manejo mais tecnificadas e racionais que se enquadram nas estratégias de sustentabilidade.

Os resultados obtidos demonstraram a rusticidade da atividade na região (SILVA & LAGES, 2001).

3.2.1 – *Melipona scutellaris* Latreille

A abelha Uruçu (*M. scutellaris*), cujo nome vem do tupi *Eeiru'su* ("abelha grande"), tem tamanho maior ou igual à *Apis mellifera*, e se destaca de outras abelhas da Zona da Mata e Litoral Nordestino pelo porte avantajado, grande produção de mel e facilidade de manejo, desenvolvido pelos povos nativos antes da chegada dos colonizadores (KERR *et al.*, 1996).

O mel desta abelha tem fins terapêuticos ou de alimento melhor para as famílias camponesas, sendo muito saboroso. Podem ser produzidos 10 litros ao ano por colônia em épocas favoráveis, embora a média seja de 2,5 a 3 litros ao ano. É altamente balsâmico e infinitamente mais rico em princípios aromáticos do que o mel de *A. mellifera* (KERR *et al.*, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Nos trabalhos mais criteriosos, os criadores são incentivados a retirar o mel com bomba sugadora, o que diminui a manipulação, o desperdício no fundo das caixas e morte de ovos e larvas quando não se inclina a colméia para escorrer o mel. No entanto, em Alagoas predomina-se ainda a coleta por perfuração dos potes e escorrimento do mel (SILVA & LAGES, 2001).

3.2.2 – *Melipona quadrifasciata* Lep.

A Mandaçaia (*M. quadrifasciata*) tem sua presença desde o Norte até o Sul da costa Atlântica, sendo que a subespécie *quadrifasciata* ocupa os Estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, preferindo maiores altitudes, umidade relativa do ar (80-90 % entre 8 e 9h) e menores temperaturas (14-16 °C). A subespécie *anthidioides* habita as regiões no Norte/Nordeste, embora no Estado de São Paulo encontrem-se as duas subespécies (AIDAR, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1996).

O mel produzido pela Mandaçaia é procurado pelo seu sabor agradável, não enjoativo. É bastante liquefeito, devido ao alto teor de umidade, fato que exige o armazenamento sob refrigeração para evitar a fermentação. Na natureza a Mandaçaia pode produzir de 1,5 a 2,0 litros de mel em épocas de boa florada, mas se criadas racionalmente a produção pode ser otimizada (AIDAR, 1996).

3.2.3 – *Melipona subnitida* Ducke

A abelha Jandaíra (*M. subnitida*) é um meliponídeo típico do sertão que pode ser criada racionalmente, onde produz uma quantidade razoável de mel. A origem de seu nome comum vem do Tupi-Guarani *Yandi-ira*, Jandaíra abelha de mel (CÁMARA *et al.*, 2004; CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006).

A sua criação por ser de fácil manejo por mulheres e crianças, contribuindo para a conservação das abelhas e de seus ecossistemas favorecendo a sustentabilidade através da restauração ambiental, polinização da flora nativa e preservação de árvores que servem de locais de nidificação. Os principais produtos da criação de Jandaíra são o mel, que é apreciado pelas populações nativas, tem ótima qualidade (sabor, cheiro, cor, nutrientes, atividade terapêutica, etc.) e valor comercial e os enxames, pela sua venda no tronco ou em cortiços (CÁMARA *et al.*, 2004).

3.2.4 – *Plebeia droryana* Friese

A abelha-mosquito é um inseto social, manso, cujos ninhos são encontrados em diversos lugares, utilizando desde árvores até barrancos, desde que os ocos sejam de tamanho apropriado e não aquecidos pela luz solar em demasia. Os favos de cria são horizontais ou helicoidais e ocorrem células reais. O invólucro está presente nesses favos e é construído com cerume. As colônias podem ser constituídas por 2.000 a 3.000 abelhas. A construção dos favos de cria é suspensa no inverno ou em uma parte dele no Estado de São Paulo. Nesta espécie, ocorrem machos normais e gigantes ambos são tratados da mesma maneira pelas operárias. São escassas as informações a cerca da composição química e qualidade do mel de *Plebéia*, e apenas sabe-se que é muito apreciado pelo seu sabor diferenciado (NOGUEIRA-NETO, 1997).

3.3 – MEL

Conforme mencionado, desde que o homem descobriu como coletar o mel para seu próprio benefício, este tem sido o produto mais difundido da criação de abelhas destinando-se a diferentes fins, seja como alimento, medicamento ou conservante de grãos e frutas. Referências da utilização do mel na medicina tradicional foram encontradas em papiros egípcios de 4.000 anos atrás, e em textos sumérios, gregos, romanos, assim como também na Bíblia e no Al-Corão (CRANE, 1983; HENRIQUES, 2004). Nas antigas civilizações do Egito e Israel, o mel era presenteado em cerimônias religiosas. Os israelitas agradeciam a Deus pela safra agrícola através da oferta dos produtos primeiramente colhidos, incluindo o mel (CRANE, 1983). Mais recentemente, alguns países direcionam

grande parte da produção de mel para fins terapêuticos (YANIV & RUDICH, 1996).

A composição do mel é bastante variada, dependendo principalmente da origem floral e de sua origem entomológica, visto que as diferentes espécies de abelhas possuem hábitos florais distintos. Além disso, fatores externos, tais como, tipo de solo, clima e período de maturação, podem também influenciar na composição do mel e, conseqüentemente, em suas propriedades biológicas (CRANE, 1983; SILVA *et al.*, 2004; ZAMORA & CHIRIFI, 2006).

Esta diversidade dificulta a proposição de uma única norma para todo o Brasil, país rico em espécies de meliponíneos e caracterizado por um grande mosaico de habitats e formações vegetais. Ao mesmo tempo, são escassos os conhecimentos sobre as características físico-químicas específicas dos méis de todo o país (VILLAS-BÔAS & MALASPINA, 2004).

Segundo Winston (2003), mel é o resultado do néctar levado pelas abelhas à colméia, dentro de sua vesícula melífera, e submetido a processos físicos (desidratação) e químicos (enzimáticos). Durante a coleta do néctar glicídico, as enzimas do pólen (catalase, peroxidase, lipase e inulase) e das glândulas hipofaríngeas, especificamente invertase (α -glicosidase), diastase (α e β amilase), glicose-oxidase, e fosfatase-ácida, são adicionadas ao mesmo, e ao se completarem as reações e a evaporação da água, o néctar “maduro”, chamado de mel, é gerado (CRANE, 1983).

Os principais componentes do mel, portanto, são os glicídios frutose e glicose (cerca de 70-80%) e a água (17-20%). A glicose-oxidase, mais ativa em soluções diluídas, reage com a glicose formando ácido glucônico (principal ácido presente no mel) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último é capaz de proteger o mel contra a decomposição bacteriana até que seu conteúdo de monossacarídeos, a partir da ação da invertase sobre a sacarose, esteja alto o suficiente para fazê-lo (WESTON *et al.*, 1999).

Ácidos orgânicos, proteínas, minerais, pigmentos, flavonóides, substâncias flavorizantes e aromatizantes, álcoois de glicídios, colóides e vitaminas também ocorrem nesse alimento (CAMPOS, 1987; ZAMORA & CHIRIFI, 2006). No entanto, considerando seu alto teor de glicídios (80% v. v⁻¹), é, antes de tudo, um alimento energético de alta qualidade, visto que a glicose presente pode ser absorvida diretamente pelo sistema muscular, especialmente o coração (LENGLER, 2007).

O mel de abelhas sem ferrão é um produto que tem apresentado uma demanda crescente de mercado, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis* em diferentes regiões do Brasil. Entretanto, ainda existem poucos estudos sobre as

características desse produto, dificultando assim a definição de padrões de qualidade para a sua comercialização, bem como o conhecimento de suas propriedades biológicas e aplicações terapêuticas (SOUZA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009).

Entretanto, Souza *et al.* (2004) avaliaram a composição centesimal do mel de abelhas nativas da região amazônica, isto é, *M. seminigra merrillae* (Jandaíra), *M. compressipes manaosensis* (Jupará) e *M. rufiventris paraensis* (Uruçu Boca de Ralo), provenientes do meliponário da “Fazenda Poranga” no município de Itacoatiara – AM, e do “Meliponário Abelhudo” em Manaus – AM. Constataram que o mel produzido por *M. compressis* é mais fluído e de cristalização mais lenta que o de *A. mellifera*. Sob o ponto de vista nutricional, a concentração média de energia de ($285,3 \pm 18,7$ Kcal em 100 g das amostras analisadas) de cada espécie ratifica o potencial do mel dessas abelhas nativas como fonte de energia, particularmente daquele proveniente de *M. rufiventris* ($305,3 \pm 2,4$ Kcal em 100g). A umidade média apresentada por tais méis foi de $28,6 \pm 4,6\%$, sendo o maior percentual para aquele de *M. compressis* ($34,6 \pm 0,5\%$) e o menor para o de *M. rufiventris paraensis* ($23,9 \pm 0,6$).

Valores similares ao da umidade de mel de *M. compressipes manaosensis* ($25,3 \pm 0,7$) haviam sido relatados em análises preliminares de méis de Tiúba (*M. compressipes*) do Piauí (25%) (SOUZA & BAZLEN, 1998). O teor de proteína desses méis foi extremamente baixo, com valores inferiores a 1%. O mesmo observou-se no tocante a cinzas e lipídios. Os autores concluíram que o mel de meliponíneos é propício à fermentação e, portanto deve ser consumido rapidamente. As abelhas nativas da região Amazônica, entretanto, face à diferença da geografia, clima e vegetação local com relação à região Nordeste, certamente resultam em produção de méis com características distintas. O mel por elas produzido é considerado na sua maioria silvestre ou heterofloral (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

3.3.1 – ANÁLISE MELISSOPALINOLÓGICA

Uma análise de grande importância no controle de qualidade do mel é a melissopalínológica, pois oferece importantes informações sobre a extração, filtração, fermentação e alguns tipos de adulterações, bem como aspectos higiênicos como contaminação por minerais em pó, fuligem e grãos de amido, além de determinar sua origem botânica e geográfica (ANKLAM, 1998; BOGDANOV *et al.*, 2004).

No que se refere ao mel, tem-se as ferramentas listadas no Quadro 2. Dentre os métodos clássicos de análises físico-químicas, a condutividade elétrica, a rotação

específica, o conteúdo de cinzas e o pH são amplamente utilizados para discriminação entre mel floral e mel de melato. Em geral, mel floral possui condutividade inferior a 0,8 mS.cm⁻¹, enquanto que méis de melato e de castanheira possui condutividade superior a 0,8 mS.cm⁻¹ (ANKLAM, 1998; BOGDANOV et al., 2004).

Em relação à rotação específica, a maioria dos méis de melato possui valores positivos, devido ao alto conteúdo de glicose (coeficiente de rotação $[\alpha]_D^{20} = + 52.7^\circ$), contudo, mel floral geralmente possui valores negativos, devido à alta concentração de frutose ($[\alpha]_D^{20} = - 92.4^\circ$) (MOREIRA & DE MARIA, 2001; DINKOV, 2003).

QUADRO 2 – Métodos complementares a avaliação polínica na determinação da origem botânica de mel.

PARÂMETRO	CONSIDERAÇÕES GERAIS
Métodos Clássicos Parâmetros físico-químicos de rotina: Condutividade elétrica, glicídios, razão glicose/frutose, atividade enzimática, prolina, cor, rotação ótica, pH e acidez)	Usados conjuntamente com as análises polínica e sensorial, condutividade elétrica e razão glicose/frutose são os mais úteis; A análise quimiométrica é promissora;
Outros métodos Determinação de fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	Mostra resultados adequados, mas não se aplica a rotina por ser muito trabalhoso
Determinação de compostos voláteis por <i>headspace</i> dinâmico ou microextração em fase sólida, seguida por cromatografia gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massa (EM) ou “narizes eletrônicos”	Métodos promissores que podem ser futuramente aperfeiçoados e desenvolvidos para análise quantitativa de compostos voláteis; “Olfatômetros” são também promissores, mas não estão comumente disponíveis em laboratórios de análises de alimentos;
Identificação de Aminoácidos	Tem algum poder de discriminação, mas depende da origem geográfica;
Ensaio <i>immunoblotting</i> de proteínas do mel, de origem polínica	Método suplementar à melissopalínologia clássica;
Identificação de Traços de elementos	Expressa algum poder de discriminação, mas depende da origem climática e geográfica
Ácidos carboxílicos alifáticos	Possui poder de discriminação limitada, a maioria dos ácidos orgânicos é adicionada ao mel pelas abelhas
Espectroscopia na região do infravermelho	Método caracteristicamente rápido, mas que por conferir apenas informações de grupos funcionais, é menos promissor;
Espectroscopia de massa	Método promissor, mas depende de instrumentação de alto custo

Fonte: Adaptado de BOGDANOV et al., 2004.

A detecção de compostos voláteis presentes em méis tem despertado interesse notadamente nas pesquisas que visam definir “marcadores químicos” para identificação da origem floral (BOGDANOV *et al.*, 2004). Silva (2006), utilizando micro-extração em fase sólida através do *headspace* e cromatografia gasosa (HS-SPME-CG), observou diferentes perfis cromatográficos. Foram identificados potenciais marcadores para os méis de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), laranja (*Citrus* sp.), assa-peixe (*Vernonia polianthes*), cambará (*Lantana montevidensis*), morrão de candeia (*Croton* sp.) e marmeleiro (*Cydonia vulgaris*), demonstrando que a metodologia pode eventualmente ser utilizada na sua certificação botânica dos méis.

A flora apícola é um conjunto de plantas presentes em uma determinada região e que desempenham papel na sobrevivência das abelhas (BARTH *et al.*, 2005). A vegetação da caatinga, por exemplo, possui espécies vegetais que alimentam as abelhas durante todo o ano e outras vegetações somente o fazem em determinados períodos, em virtude da preferência das colônias e da própria fenologia do componente botânico (NORONHA, 1997).

No Brasil, a flora apícola é rica e variada, mas ainda são escassas as informações sobre as plantas melíferas, que leva apicultores a utilizar muitas informações de zonas temperadas de outros países (ALMEIDA-ANACLETO, 2007).

As abelhas melíferas são fiéis ao visitar flores de plantas muito relacionadas entre si para coleta de mel e pólen (ALMEIDA-ANACLETO, 2007). Logo, a análise polínica dos produtos apícolas é uma ferramenta para caracterizar a flora visitada pelas abelhas, com isso direcionar o reflorestamento de áreas como a caatinga na região Nordeste, com plantas nativas e de interesse apícola, maximizando assim a produção de seus produtos apícolas, em especial o mel (LIMA, 1995; NORONHA, 1997).

A partir dessa análise de mel chega-se às espécies vegetais de interesse apícola ao redor de um apiário e dentro do raio de ação das abelhas que segundo Winston (2003) é de um a dois quilômetros.

Espécies que contribuem na dieta das abelhas exclusivamente com pólen, com néctar, ou com ambos podem ser a algaroba (*Prosopis juliflora* SW.), o juazeiro (*Zyziphus joazeiro* Mart.), a jurema preta (*Mimosa tenuiflora* Willd.), o marmeleiro (*Croton sonderianus* Muell. Arg.), o sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth), a vassourinha (*Scoparia dulcis* L.), a vassourinha de botão (*Borreria verticillata* L.), entre outras (LIMA, 1995; NORONHA, 1997). Visa, portanto, maximizar a utilização dos recursos tróficos, principalmente em áreas de vegetação natural (ALCOFORADO-FILHO, 1998).

Os estados brasileiros possuem uma abundante e variada flora apícola, avaliada em mais de 20 mil espécies diferentes, produzindo méis de primeira qualidade com sabores e coloração diversa, aceitos pelos mercados mais exigentes do mundo (SOUZA, 2006b).

Além da necessidade de se conhecer a flora apícola do Estado de Alagoas, existe também uma necessidade de trabalhar com a preservação da mesma, uma vez que 51,9% dos apicultores afirmam haver desmatamento na região, levando a extinção de espécies apícolas importantes como: marmeleiro (*Croton* sp.), pau d'arco (*Tabebuia* sp.), aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), juazeiro, algaroba, cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), sucupira (*Bowdichia virgiliodes* Kunt), cajarana (*Simabia trichilioides* St. Hil.), murici (*Byrsonia gardneriana* Juss.) e umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). Outros nomes vulgares de plantas citados pelos apicultores são angico, angico vermelho, canelinha, mata atlântica, caatingueira, ingá, barrigudo, canafístula, carabeira, quixabeira, braúna, pereira, jurema e pau terra (SOUZA, 2006b).

O mel floral pode ser monofloral ou unifloral, quando obtido de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possuir características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias, ou multifloral, quando obtido de diferentes origens florais (BRASIL, 2000). O mel unifloral deve conter no mínimo 98% de dominância de determinado pólen e ser colhido de uma região com predominância floral na área de visitação das abelhas (BARTH, 2005). Na região Nordeste, o mel assume caráter heterofloral, devido à grande variação de fontes de néctar e a casual mistura de méis nos entrepostos (PAULA NETO, 2005).

Fazem parte do mel os grãos de pólen provenientes predominantemente das plantas fornecedoras de néctar (nectaríferas), de plantas produtoras de pólen (poliníferas), ou ainda de plantas anemófilas (flores sem néctar, pólen como fonte de proteínas). As plantas nectaríferas compreendem um grande número de espécies, variando de região para região (BARTH, 1989).

Entretanto, não basta realizar uma simples classificação dos tipos de grãos de pólen encontrados nas amostras de mel conforme sua frequência, mas é necessário avaliar e ponderar estas categorias e relacioná-las às propriedades e características das plantas que os produziram (BARTH, 1989; BARTH *et al.*, 2005) e as características físico-químicas do mel pouco conhecidas, em regiões tropicais onde existe grande diversidade de flora apícola associada às taxas elevadas de temperatura e umidade (SODRÉ *et al.*, 2007).

3.3.2 – QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE MEL

Segundo BRASIL (2000), o mel é o alimento produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou ainda de excreções de insetos sugadores de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia. Apresenta alta quantidade de água e glicídios, principalmente frutose e glicose, além de pequenas quantidades de maltose, sacarose e polissacarídeos e outras moléculas presentes no néctar (ZAMORA & CHIRIFI, 2006). Segundo CRANE (1983), o mel apresenta cerca de 181 substâncias, dentre elas, ácidos, proteínas, minerais, pigmentos, substâncias flavorizantes e aromatizantes, álcoois de glicídios, colóides e vitaminas (AL-MAMARY *et al.*, 2002).

TABELA 1 – Parâmetros físico-químicos de mel de abelhas nativas e africanizadas.

PARÂMETRO	Abelhas nativas * (SOUZA <i>et al.</i> , 2006)	<i>Apis mellifera</i> Brasil (2000)
Glicídios Redutores (GR) (g.100g ⁻¹)	58 - 75,7	Mínimo 65
Sacarose (g.100g ⁻¹)	1,1 - 4,8	Máximo 6
Umidade (%)	19,9 - 41,9	Máximo 20
pH	3,15 - 4,66	-
Acidez Livre (meq. Kg ⁻¹)	5,9 - 109	Máximo 50
Cinzas (g.100g ⁻¹)	0,01 - 1,18	Máximo 0,6
Diastase (DN)	0,9 - 23	Mínimo 8
HMF (mg. Kg ⁻¹)	0,4 - 78,5	Máximo 60
Condutividade Elétrica (mS. cm ⁻¹)	0,49 - 8,77	-

*152 amostras de mel de meliponíneos oriundas do Brasil, México, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Suriname e Trinidad e Tobago.

O néctar consiste em uma secreção aquosa da planta, que contém de 5 a 80% de glicídios (fonte energética da dieta e armazenamento de mel) dependendo da origem floral, e pequenas quantidades de compostos nitrogenados, minerais, ácidos orgânicos, vitaminas, lipídeos e substâncias aromáticas (MOREIRA & DE MARIA, 2001; WINSTON, 2003).

Embora os meliponíneos produzam mel em menor quantidade, este se diferencia do mel de *Apis*, principalmente no aroma e sabor, alcançando, com isso, um melhor valor de mercado (SOUZA *et al.*, 2006; ALMEIDA-ANACLETO, 2007). Apesar disso, a

legislação brasileira que regulamenta a padronização do mel para fins de comercialização (BRASIL, 2000), assim como o *Codex Alimentarius Commission* só atende aos parâmetros de qualidade e identidade do mel de *A. mellifera*, o que indica a necessidade de estudos sobre os mesmos que contribuam para atualização dos critérios de análise de qualidade vigentes

A Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define que o mel, segundo sua origem botânica, pode ser classificado como floral (obtido a partir de néctar das flores), ou de melato (obtido a partir de secreção de insetos sugadores ou de secreções de néctar extrafloral) (BRASIL, 2000).

As mesmas características edafoclimáticas e vegetais que possibilitam ao Brasil e a Alagoas um grande potencial apícola, também levam a méis com amplo espectro de características. Estudos voltados para a sua caracterização, portanto, possibilitam a criação de padrões de qualidade diferenciados por região e origem entomológica, subsidiando a melhoria e garantindo a qualidade ao consumidor (EVANGELISTA-RODRIGUES *et al.*, 2005; MARCHINI & SOUZA, 2006).

Os glicídios representam cerca de 95-99% dos compostos sólidos do mel, e entre eles estão a glicose, frutose, maltose, sacarose, isomaltotetraose, maltulose, nigeriose, turanose, cojibiose, gentiobiose, laminaribiose, leucrose, isopanose, isomaltulose, erlose, maltotriose, rafinose, dextrantose, isomaltopentose, centose, cestose e panose (CRANE, 1983). Sendo que os glicídios redutores (GR), em especial frutose e glicose, encontram-se em maior quantidade. Estes se caracterizam por possuírem um grupo carbonílico primário ou secundário, formando hemicetais ou hemiacetais, capazes de serem oxidados em soluções alcalinas. Os que não possuem essa capacidade, como a sacarose, são denominados de glicídios não redutores (MOREIRA & DE MARIA, 2001). Segundo Silva *et al.* (2004), os méis que apresentam maiores percentuais de GR, apresentam também coloração mais escura.

Tais moléculas influenciam diretamente a viscosidade, a higroscopicidade, a granulação, a acidez e o valor energético desse produto, além de auxiliar na identificação da origem botânica, através da relação frutose/glicose (F/G). (MOREIRA & DE MARIA, 2001; BOGDANOV, 2002; GLEITER *et al.*, 2006; ÖZCAN *et al.*, 2006).

Em função da pouca solubilidade, a glicose determina a tendência do mel à cristalização ou granulação, sendo que o maior problema relacionado à precipitação de glicose é o aumento da atividade de água na fase líquida, o que favorece a fermentação por

microrganismos osmofílicos, principalmente leveduras. A frutose, por sua vez tendo alta higroscopicidade, determina o nível de doçura do mel (MOREIRA & DE MARIA, 2001; MARCHINI & SOUZA, 2006).

Diversos métodos para determinação de GR são utilizados, dentre eles, os titulométricos, gravimétricos, espectrofométricos e cromatográficos (BOGDANOV, 2002; CAMPOS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003). O método clássico de Lane-Eynon envolve a redução da solução de Fehling, modificada por Soxhlet e fundamenta-se na redução de íons cobre em soluções alcalinas (SILVA *et al.*, 2003).

Dentre os dissacarídeos encontrados no mel, a sacarose prevalece, e quando ocorre em valores altos, geralmente indica que o mel encontra-se “imaturo”, colhido prematuramente visto que tal molécula ainda não foi totalmente convertida à glicose e frutose pela ação da invertase (BOGDANOV, 2002; MARCHINI & SOUZA, 2006).

Silva *et al.* (2004) detectaram um percentual médio de GR de 77,25%, com variação entre 68,92 e 85,49 g . 100 g⁻¹, estudando méis de *A. mellifera* de diferentes floradas no Estado do Piauí, isso denota a influência da origem floral na composição química do mel. Segundo SOUZA *et al.* (2006), a determinação de glicídios também pode ser usada como ferramenta na diferenciação dos méis de abelhas sem ferrão.

Para méis de abelhas sem ferrão, Souza *et al.* (2006) compilaram resultados de 152 amostras de méis oriundas do México, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Suriname, Trinidad e Tobago e Brasil e observaram valores que variaram entre 58,0 a 75,7 g. 100g⁻¹ de GR em mel de abelhas nativas.

Alves *et al.* (2005), por sua vez, avaliando mel de *M. mandacaiá* proveniente do município de São Gabriel, região semi-árida do Estado da Bahia, detectaram que o conteúdo de GR variou entre 64,29% e 82,10%, com média de 74,82 ± 4,28 %.

A umidade é o segundo componente em níveis elevados no mel, influenciando diretamente a viscosidade, a coloração e a fluidez deste alimento. Diferentes fatores podem afetar o conteúdo de umidade do mel, dentre eles, as condições climáticas do meio ambiente no período da manipulação e da coleta, origem botânica e período de maturação do mel, critério que representa inclusive, estabilidade microbiana do mel (SILVA *et al.*, 2004; YANNIOTIS *et al.*, 2006; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007; FINOLA *et al.*, 2007).

É provável que méis produzidos durante a época chuvosa apresentem maior umidade em função da saturação do ar e do grande fluxo de néctar que ocorre logo após as chuvas, dificultando a remoção da água pelas abelhas e isso pode comprometer a

estabilidade do alimento, pois méis com umidade maior que 18 %, possuem vida de prateleira comprometida (SILVA *et al.*, 2004). Após a extração do produto seu índice de umidade pode mudar a depender das condições de armazenamento (ZAMORA *et al.*, 2006).

Segundo EVANGELISTA-RODRIGUES *et al.* (2005), a abelha africanizada, de uma maneira geral, só opercula o mel quando este já se encontra em ponto de coleta (17-18 % de umidade). Logo, alterações significativas de umidade ocorrem após a coleta e manipulação do mel. Por outro lado, o mel de meliponíneos tem como principal característica a diferenciação no teor de umidade, que pode variar entre 19,9 e 41,9 %, e isso o torna menos denso que o mel das abelhas africanizadas (ALVES *et al.*, 2005; SOUZA, 2008).

A legislação brasileira para determinação da identidade e qualidade do mel estabelece como método para a avaliação do teor de umidade refratométrico de Chataway, baseado numa relação entre índice de refração e conteúdo de sólidos solúveis presentes (BRASIL, 2000; BOGDANOV, 2002). O índice de refração das substâncias líquidas depende da temperatura, e geralmente os refratômetros estão regulados a 20 °C. Caso o mel esteja armazenado a uma temperatura diferente, é necessário que seja acrescentado ou diminuído o valor de 0,00023 para cada °C a mais ou a menos nessa análise (BOGDANOV, 2002).

O pH é um importante fator monitorado durante a extração e estocagem do mel, pois influencia na textura, estabilidade e preservação (ÖZCAN *et al.*, 2006). De acordo com Snowdon & Cliver (1996), o pH do mel varia entre 3.4 e 6.1, com média de 3.9.

Souza (2008), avaliando a qualidade físico-química de méis de abelhas nativas do Estado da Bahia observou uma variação de pH entre 3,12 e 6,5, enquanto que o teor de acidez variou entre 5,1 a 116,8 meq. Kg⁻¹.

Com relação aos ácidos orgânicos presentes nos alimentos, estes influenciam seu sabor, odor, cor, estabilidade e manutenção da qualidade (CECCHI, 2003). A acidez do mel encontra-se fortemente associada ao conteúdo de glicose, uma vez que este é convertido, através da ação da D-glicose-oxidase, em ácido glucônico, e este representa cerca de 70- 90 % dos ácidos orgânicos presentes (MOREIRA & DE MARIA, 2001). Além dessa conversão, fatores como origem do néctar, ação das bactérias durante a maturação, e minerais presentes na composição influenciam a acidez do mel (BERTOLDI *et al.*, 2004).

Características como aroma, sabor, coloração, viscosidade e propriedades

medicinais dos méis variam de acordo com a sua origem botânica e com a espécie de abelha que a produziu (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006). No mercado mundial, o mel é comumente classificado pela cor – os claros alcançam maiores preços que os escuros, havendo uma relação entre cor e sabor (geralmente méis com sabor delicado são claros, e méis escuros são fortes) (LACHMAN *et al.*, 2007).

De acordo com Lachman *et al.* (2007), o alto teor mineral do mel determina sua alta condutividade elétrica. Quanto ao teor de cinzas, este expressa a riqueza em minerais. Segundo Cecchi (2003), cinza é o resíduo inorgânico de um alimento que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO₂, H₂O e NO₂. A composição de minerais do mel varia entre 0,1 a 1,0 %, sendo o potássio o mineral predominante, seguido por cálcio, magnésio, sódio, enxofre e fósforo. Além de traços de elementos como ferro, cobre, zinco e manganês. Os minerais Al, B, Mg, Mn, Ni, e Zn são mais encontrados em méis de melato do que em méis florais. Porém, o Cu encontra-se em valores similares em méis florais e mel de melato (LACHMAN *et al.*, 2007; ALVES, 2008).

O conteúdo mineral do mel pode indicar a sua origem geográfica, sendo também indicador de poluição ambiental quando encontrado em concentrações elevadas, além de ser um indicador de contaminação provocada pela não decantação e/ou filtração no final do processo de extração ou falha de manipulação (ACQUARONE *et al.*, 2007; FINOLA *et al.*, 2007).

Embora não seja exigido pela legislação brasileira obter análise da condutividade elétrica do mel, esta representa um bom critério para a determinação botânica do mel, auxiliando a determinação polínica (BOGDANOV, 2002). Também, é utilizada como critério na exportação de méis para Alemanha. Quanto maior a condutividade, melhor é o preço pago pelo mel (ALVES, 2008). Tal análise tem correlação com o conteúdo de cinzas, pH, acidez, sais minerais, além de proteína e outras substâncias presentes no mel (BOGDANOV, 2002).

A concentração total de proteínas e aminoácidos livres em mel é bastante variável em função de sua origem floral, bem como das condições ambientais de cada região, mas em geral, sua concentração é baixa e pouco se sabe sobre sua identidade, especialmente nos produtos de abelhas nativas (SOUZA, 2008; BOGDANOV, 2002).

Os valores de proteína em mel de *Apis* estão compreendidos entre 0,0036 e 2,79% (ARRUDA *et al.*, 2004). Alves (2008), avaliando mel orgânico de *A. mellifera*, produzido em uma APA do Estado do Paraná, observou que o conteúdo de proteína variou de 0,37 a 0,63 %, com valor médio de $0,50 \pm 0,07$ %. O método utilizado foi o de Kjeldahl, que se

fundamenta na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, por meio de digestão ácida e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada. O nitrogênio fixado é determinado por titulação com ácido sulfúrico 0,001 N e por meio de um fator de correção (6,25) o resultado é transformado no valor percentual de proteína bruta presente na amostra (CECCHI, 2002).

Souza (2008), avaliando méis de nativas do Estado da Bahia, observou uma variação de 0,04-2,37 % em relação ao conteúdo protéico, enquanto Almeida-Anacleto (2007) observou uma variação de 0,15-0,57 % para méis de nativas no município de Piracicaba (São Paulo), ocorrendo o menor conteúdo no mel de *Scaptotrigona bipunctata*, e o maior no mel de *T. angustula*.

Dentre os aminoácidos livres encontrados no mel, a prolina predomina, representando cerca de 50-85% do total dos aminoácidos presentes (BOGDANOV, 2002). Entretanto, dados quanto à ocorrência desse aminoácido em méis de nativas são escassos.

Além disso, muitas substâncias presentes no mel, responsáveis por seu *flavor* e atividade biológica, são termolábeis, como ocorre com a enzima α -amilase. De acordo com a *Honey Quality and International Regulatory Standards* (BOGDANOV, 2002), a escala Gothe corresponde ao conteúdo de amido hidrolisado em 1 hora a 40 °C por 100 g de mel, sendo que a atividade diastásica não deve ser inferior a 8° DN. A técnica mede a atividade da α -amilase do mel na presença do amido e informa indiretamente a qualidade do mel de acordo com o grau de digestão sofrido pela molécula de amido em função do tempo (BOGDANOV, 2002).

A presença dessa enzima foi inicialmente relacionada à saliva da abelha, ao pólen contido no mel e ao néctar floral, sendo que atualmente se reconhece que é originada a partir de secreções salivares das abelhas melíferas (ODDO *et al.*, 1990). Não é um bom indicador, portanto, da origem floral do mel (BOGDANOV *et al.*, 2004).

Segundo Sodré *et al.* (2007), os méis produzidos em regiões quentes e secas apresentam menor quantidade de enzimas do que os de regiões quentes e úmidas.

No tocante ao 5-hidroximetil-furfuraldeído (HMF), a presença deste no mel foi originalmente considerada como uma evidência de adulteração com sacarose comercial. Este composto é formado pela reação de certos glicídios, como a frutose, com ácidos (Figura 5). O tratamento térmico (acima de 40 °C) e o armazenamento inadequado levam a níveis crescentes do HMF em mel de *A. mellifera* (BOGDANOV, 2002; BOGDANOV *et al.*, 2004; D'ARCY & HAWES, 2006; MARCHINI & SOUZA, 2006). Quando o HMF está presente em concentrações elevadas, é possível que tenha ocorrido perda de algumas

enzimas, como por exemplo, a glicose-oxidase e a α -amilase (VILHENA & ALMEIDAMURADIAN, 1999; MARCHINI & SOUZA, 2006).

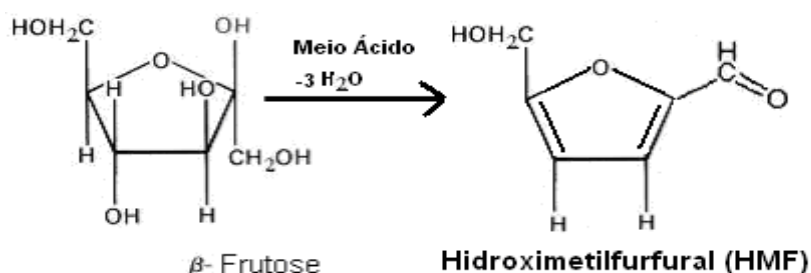


FIGURA 5. Desidratação (simplificada) de ceto-hexoses formando hidroximetilfurfural (HMF).

3.3.3 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE MEL

A principal propriedade de compostos bioativos responsável pelas inúmeras aplicações terapêuticas do mel é a antioxidante. Quando presentes em baixas concentrações, tais substâncias, atrasam ou impedem a oxidação do substrato oxidável (AL-MAMARY *et al.*, 2002). Diferentes estudos têm demonstrado o potencial antioxidante do mel, relacionando-o principalmente com sua origem botânica (AMIOT *et al.*, 1989; BERTONCELJ *et al.*, 2007; KÜÇÜK *et al.* 2007).

As reações oxidativas causam efeitos deletérios a alimentos e a sistemas biológicos. Atribui-se a elas, por exemplo, o escurecimento enzimático de frutas e vegetais, a modificação lipídica de carnes, e o estímulo ao desenvolvimento de doenças de grande importância na atualidade, como a arteriosclerose, as enfermidades coronárias e determinados tipos de câncer. Isto porque os ácidos graxos polinsaturados, constituintes dos fosfolipídios de membranas celulares, são altamente suscetíveis ao ataque de radicais livres (MARCUCCI, 1996; D'ARCY, 2005; BERTONCELJ *et al.* 2007; BORSATO, 2008).

Algumas enzimas presentes em frutas e verduras têm a capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e conduzir ao escurecimento enzimático de alimentos como frutas e vegetais. A reação enzimática ocorre durante o envelhecimento ou senescência de frutas e legumes. Além disso, alguns tratamentos tecnológicos como, corte, trituração, além de condições de armazenamento, emprego de baixa temperatura e descongelamento, podem acelerar o processo (D'ARCY, 2005).

Uma vez que a procura de aditivos naturais tem aumentado, visando estender a vida

de prateleira de alimentos, em especial, vegetais e frutas, o mel tem sido investigado como uma alternativa, especialmente ao uso de conservantes químicos (por exemplo, sulfitos) que visem evitar o escurecimento de alimentos. O mel tem sido aplicado com sucesso em fatias de maçã e sumo de uva especialmente pela presença de substâncias fenólicas, particularmente, *trans*-cinâmico e ácido *p*-cumárico. Assim, além da inibição do escurecimento de frutas e hortaliças, o mel pode contribuir para melhorar a aparência, reforçar o aroma, preservando o valor nutritivo (DARCY, 2005; BERTONCELJ *et al.* 2007).

As principais espécies reativas (radicais livres) são centradas no oxigênio (ERO) ou no nitrogênio (ERN), mas a partir destas, podem ser geradas outras formas reativas. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares [hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) e alcoxila ($\text{RO}^\bullet$)] e os não-radicalares [O_2 , H_2O_2 , e ácido hipocloroso]. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo, atacando proteínas, DNA e lipídeos, outros são reativos apenas contra os lipídios (D'ARCY, 2005; RIBEIRO *et al.* 2005).

As ERO são produzidas continuamente em organismos vivos por meio do metabolismo oxidativo, sendo muitas vezes de extrema utilidade, como na ativação do sistema imunológico (macrófagos utilizam o H_2O_2 para destruição de bactérias). O metabolismo aeróbico é caracterizado pela produção de ERO, e seu consumo por antioxidantes. No entanto, quando há um desbalanço entre as substâncias pró-oxidantes/antioxidantes, ocorre o distúrbio conhecido por estresse oxidativo (OLDONI, 2007; RIBEIRO *et al.* 2005).

Diferentes métodos são empregados para analisar o potencial antioxidante do mel e demais produtos apícolas, dentre eles, a quimioluminescência, baseando-se nos reagentes da reação de Fenton (CHENG *et al.*, 2003), o método da redução do ferro Fe^{3+} a Fe^{2+} (Ferric-reducing antioxidant power) (FRAP) (BERETTA *et al.*, 2005; KÜÇÜK *et al.*, 2007), além daqueles em que há captura de hidrogênio pelo radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (Figura 6), com mudança de cor de violeta para amarelo (CHENG *et al.*, 2003; GHELDON *et al.*, 2006), ou captura do radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) - bastante usado para substâncias hidrofílicas ou lipofílicas (BALTRUSAITYTE *et al.*, 2007), ou ainda, aquele em que ocorre captura do radical peroxila (ORAC) (BERETTA *et al.*, 2005).

O resultado da análise depende da especificidade do radical pelos reagentes da

reação de cada método. Antioxidantes podem ser hidrossolúveis, lipossolúveis ou ambos, e a escolha do método de análise deve ser feita conforme a natureza do composto investigado (CHENG *et al.*, 2003).

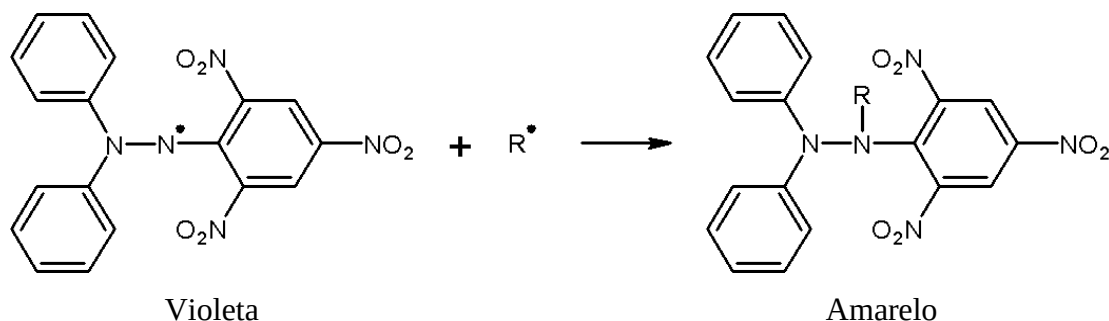


FIGURA 6 – Sequestro do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidante. Fonte: CHENG *et al.*, 2003.

Conforme estudos de Beretta *et al.* (2005), correlações significativas foram observadas para os marcadores de antioxidantes em diferentes métodos, variando esta de 0,933 a 0,716, e há uma estreita correlação entre antioxidantes, conteúdo de fenóis e intensidade de cor do mel. Os resultados dessas pesquisas demonstraram que somente através da combinação desses testes e da determinação dos teores de fenóis totais é que se pode alcançar uma rigorosa caracterização do potencial antioxidante do mel, auxiliando esta na compreensão de suas propriedades biológicas e possíveis aplicações terapêuticas.

Duas classes de compostos com atividade antioxidante estão presentes no mel – os que possuem atividade enzimática, incluindo glicose-oxidase e catalase, e os antioxidantes não enzimáticos, como ácido ascórbico, ácidos fenólicos (caféico, cumárico, elágico, clorogênico) flavonóides, derivados de carotenóides, e produtos da reação de *Maillard* além de aminoácidos (D'ARCY, 2005; BALTRUSAITYTE *et al.*, 2007; KUCUK *et al.* 2007).

A glicose-oxidase produzida nas glândulas hipofaríngeas das abelhas oxida a D-glicose a D-glucono-delta-1,5-lactona, que é posteriormente hidrolisada a ácido glucônico, o principal ácido orgânico encontrado no mel (FRANCHINI & MATOS, 2006). Tal enzima, que é inativada por exposição do produto à luz solar (THEUNISSEN *et al.*, 2001), atua como conservante natural do mel, uma vez que reduz o O₂ atmosférico em H₂O₂, e este age como barreira antimicrobiana na superfície do mel (BOGDANOV, 1997).

Por outro lado, a alta habilidade dos fenóis em neutralizar ERO está fortemente

associada com sua estrutura, como as duplas ligações e o número de grupos hidroxilas em anéis aromáticos, principalmente de flavonóides e ácidos cinâmicos (LEJA *et al.*, 2007).

Assim, se por muito tempo focou-se o interesse nos efeitos nocivos causados por compostos fenólicos à saúde humana, especialmente pela afinidade de certos polifenóis a macromoléculas como proteínas, carboidratos e enzimas digestivas, diminuindo sua digestibilidade (CARPES *et al.*, 2007), as pesquisas atuais tem sido relacionadas à sua ação antioxidante. Os compostos fenólicos caracterizam-se por possuírem um anel benzênico e um ou mais grupamentos hidroxila na molécula (Figura 7), conferindo-lhe propriedades antioxidantes que podem estar relacionadas com a sua capacidade de reduzir o íon quelato férrico e catalisar peroxidação lipídica (BALTRUSAITYTE *et al.*, 2007).

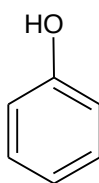


FIGURA 7 - Estrutura do fenol (sinonímia: ácido carbólico, ácido fênico, hidroxibenzeno, ou hidroxifenil) o mais simples dos compostos fenólicos.

A análise do perfil cromatográfico associado ao estudo dos espectros de absorvância de ultravioleta, obtidos pelo detector de fotodiodo em méis de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), permitiu isolar e identificar os ácidos fenólicos gálico, vanílico, *para*-cumárico, ferúlico e cinâmico (Figura 8), enquanto para os méis silvestres foram isolados os ácidos gálico, vanílico, clorogênico, *orto*-cumárico, cinâmico e 2-metoxicinâmico (SILVA, 2004). D'arcy (2005) observou a presença dos ácidos gálico, clorogênico, caféico, cumárico, ferúlico, e elágico em méis florais.

Estudos realizados por Lianda (2004) com méis silvestres evidenciaram a presença dos ácidos gálico, vanílico, *p*-cumárico, *p*-metoxibenzóico, *p*-metoxicinâmico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico e sinápico, e do flavonóide morina, enquanto que análises de amostras de mel laranjeira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] apresentaram ácidos gálico, vanílico, *p*-cumárico, *p*-metoxicinâmico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecóico, siríngico, sinápico e cinâmico (Figura 8) e os flavonóides miricetina e quercetina (Figura 09).

Estas substâncias, além de suas propriedades biológicas conhecidas, tornaram-se marcadores químicos para a caracterização da origem botânica e/ou geográfica dos méis de *A. mellifera*. Nesse mesmo estudo, foram realizados ensaios biológicos nos quais se avaliaram *in vivo* e *in vitro* a atividade antitumoral da fração rica em compostos fenólicos

do mel silvestre, proveniente da cidade de Itararé-SP, contra o carcinoma de Erlich em camundongos. Verificou-se que a citotoxicidade pouco significativa *in vitro* (25% de inibição do crescimento), porém, os resultados *in vivo* apresentaram significativa inibição do crescimento do tumor e aumento da sobrevida dos animais (67% dos animais ficaram isentos de tumor após 75 dias de tratamento).

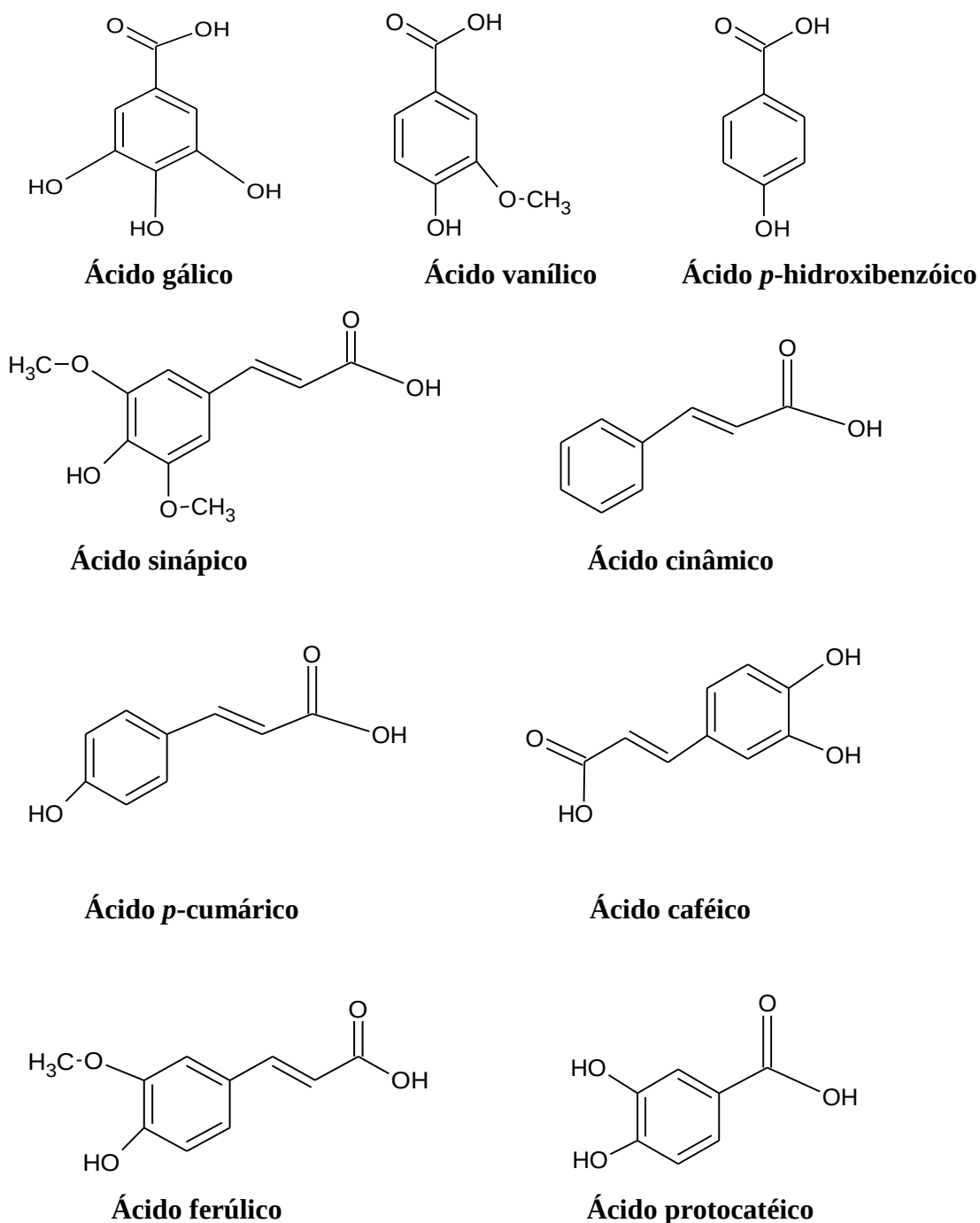


FIGURA 8 – Exemplos de ácidos fenólicos presentes em mel, pólen, própolis e geléia real.

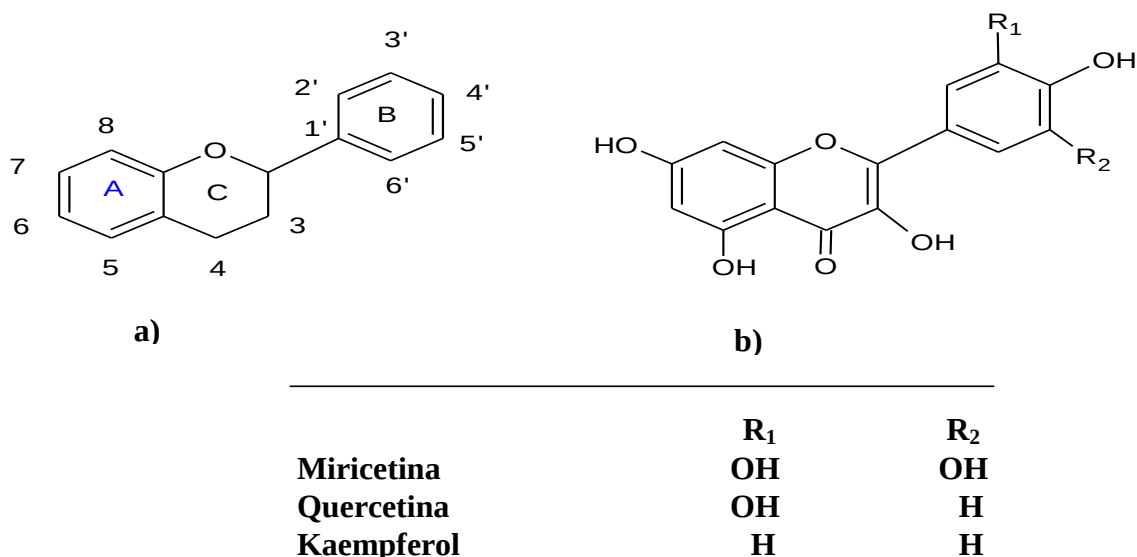
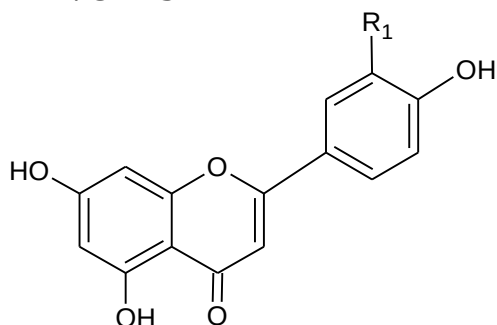


FIGURA 9 – a) Estrutura química típica dos flavonóides [composta por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)]; **b)** alguns flavonóides agliconas.

Existem cerca de 5.000 flavonóides naturais largamente distribuídos em alimentos vegetais e seus derivados, como frutas, legumes e verduras, nozes, sementes, flores, chás, vinhos, própolis, mel e pólen (CUSHNIE & LAMB, 2005), Figura 10. Os flavonóides são polifenóis caracterizados por um esqueleto de 15 carbonos distribuídos em três anéis, sendo dois benzênicos (A e B) conectados com um anel heterocíclico C, que pode ser pirano ou pirona (se possuir um grupo carbonila na posição 4) (CUSHNIE & LAMB, 2005; SILVA, *et al.*, 2006).

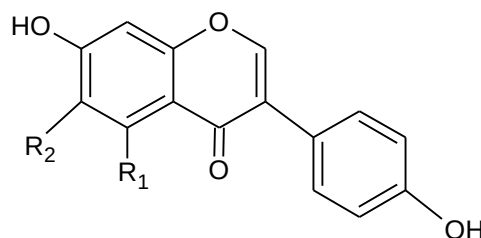
Flavonóides foram descobertos na década de 30, pelo químico húngaro Dr. Albert Szent-Györgyi, que foi laureado em 1937 com o prêmio Nobel pela descoberta da vitamina C (ácido ascórbico), e que comprovou a capacidade destes em fortificar as paredes dos capilares de forma diferente daquela. Tais compostos são provenientes do metabolismo secundário de plantas e derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com três grupos acetil-CoA. Possuem ação antioxidante, minimizando a peroxidação lipídica e o ataque de radicais livres, protegendo os organismos produtores da radiação ultravioleta (OLDONI, 2007; RIBEIRO *et al.* 2005). Podem ser encontrados na forma livre (geninas) ou ligados a glicídeos, sendo os primeiros insolúveis em água e os heterosídeos são hidrossolúveis.

FLAVONAS



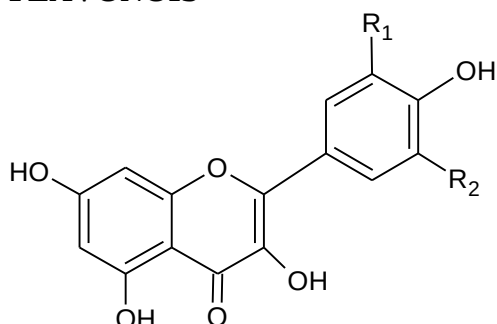
R1 = H: Apigenina
R1 = OH: Luteolina

ISOFLAVONAS (O anel fenólico B está unido ao átomo C3 do anel da pirona)



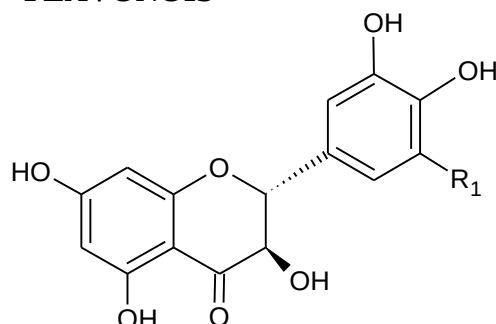
R1 = H; R2 = H: Daidzeína
R1 = OH; R2 = H: Genisteína
R1 = H; R2 = OCH3: Gliciteína

FLAVONÓIS



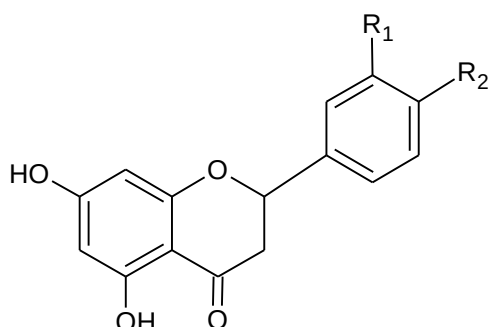
R1 = H; R2 = H: Kaempferol
R1 = OH; R2 = H: Quercetina
R1 = OH; R2 = OH: Mirecetina
R1 = OCH3; R2 = H: Isorametina

FLAVONÓIS



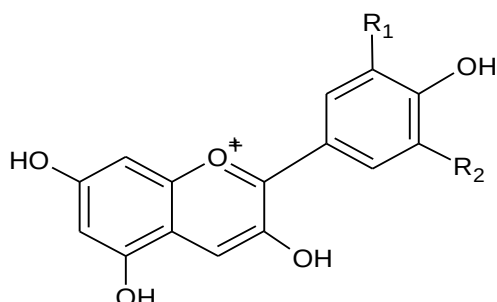
R1 = H: (+) - Catequina
R1 = OH: (+) - Galocatequina

FLAVANONAS



R1 = H; R2 = OH: Naringerina
R1 = OH; R2 = OH: Eriodictol
R1 = OH; R2 = OCH3: Hesperetina

ANTOCIANIDINAS



R1 = H; R2 = H: Pelagonidina
R1 = OH; R2 = H: Cianidina
R1 = OH; R2 = OH: Delfinidina
R1 = OCH3; R2 = OH: Petunidina
R1 = OH; R2 = OCH3: Malvidina

FIGURA 10 - Flavonóides encontrados em mel e outros produtos apícolas.

Apesar de o termo flavonóide derivar do latim *flavus* ("amarelo"), observa-se que flavonóis e flavonas são incolores, e que a classe das antocianinas possuem substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul (CUSHNIE & LAMB, 2005).

A existência de uma grande diversidade estrutural dos flavonóides é explicada pelas modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (ADELMANN, 2005; CUSHNIE & LAMB, 2005), e sua ingestão interfere na absorção e na ação de vitaminas, nos processos de cicatrização, auxiliando no efeito vasodilatador e hipotensor, no aumento de resistência alérgica, além de apresentarem atividade antimicrobiana, moduladora do sistema imune (CUSHNIE & LAMB, 2005; MENEZES, 2005), e antiviral, inibindo a replicação do HIV - vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida (LIN *et al.* 1997).

Diferentes fatores influenciam o perfil de flavonóides nos méis, dependendo principalmente da origem floral. O néctar é a principal fonte de compostos fenólicos presentes no mel, sendo, com isso, uma ferramenta auxiliar a análise polínica para identificação da origem botânica do mel (KUÇUK *et al.* 2007; LIANDA, 2009). Fatores sazonais e condições ambientais podem influenciar na qualidade e porcentagem desses antioxidantes no mel (AL-MAMARY *et al.*, 2002; BALTRUSAITYTE *et al.*, 2007), além de condições de armazenamento e temperatura de exposição (TURKMEN *et al.*, 2006).

Conforme estudos de Gheldof *et al.* (2002), os principais flavonóides presentes no mel são apigenina, luteolina, quercetina, pinobanksina, pinocembrina (Figura 10-11), cistina, galangina e canferol, sendo estes, responsáveis por inúmeras características do mesmo, dentre elas coloração e “*flavour*”, além de suas propriedades biológicas, como inativação de enzimas e retardo de oxidação lipídica (AL-MAMARY *et al.*, 2002).

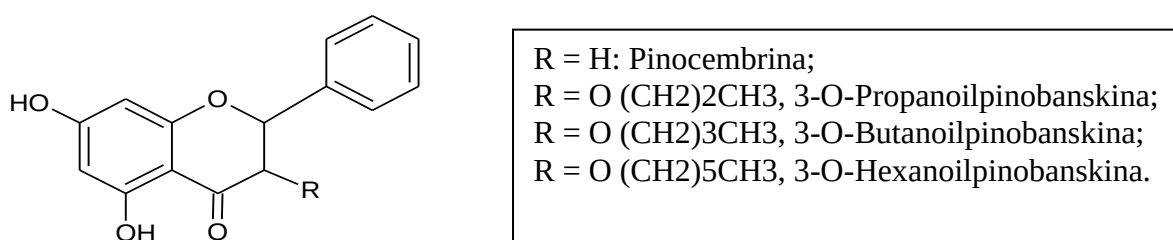


FIGURA 11 - Algumas flavanas encontradas em mel, própolis e pólen apícola.

3.3.4 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MEL

A efetividade dos agentes antimicrobianos depende de alguns fatores, como o pH, o mecanismo de ação envolvido, a atividade de água, a umidade, a temperatura, a pressão

osmótica e a composição do substrato. Além dos constituintes antioxidantes, o mel possui características que contribuem para o seu perfil antimicrobiano tópico (BOGDANOV, 1997), como o H_2O_2 formado pela oxidação da glicose, principalmente durante a maturação do mel, ou, ainda, quando o mel é diluído (NOGUEIRA-NETO, 1997; KUÇUK *et al.*, 2007).

Cerca de 80% (v. v⁻¹) do mel é composto por uma mistura de glicídios resultando em baixa de atividade de água. Esta condição é inibitória para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos patogênicos ao homem (BOGDANOV, 1997). Macedo (2007) avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* de soluções aquosa de mel (15% e 25%) de abelhas africanizadas e de *M. quadrifasciata* (Mandaçaia), através do método de difusão em ágar. Observou que o mel de abelha sem ferrão apresentou atividade antimicrobiana superior à do mel de *Apis*, e uma vez que esta se deu principalmente ao efeito osmótico, isto é, o controle negativo (solução de glicose em concentração glicídica equivalente à dos méis) apresentou resultado semelhante. Contudo, mais estudos são necessários para uma avaliação eficiente da contribuição da origem entomológica e botânica para esse efeito dos méis (DEMERA & ANGERT, 2004).

No entanto, em diversos estudos nos quais foram empregada uma solução de glicídios em concentração semelhante à do mel testado, constatou-se que o potencial osmótico não foi o fator determinante na atividade antimicrobiana (FRENCH *et al.*, 2005; MACEDO, 2007).

Staphylococcus aureus, uma bactéria Gram positiva, é um dos microrganismos mais estudados em ensaios de atividade antimicrobiana, sendo relatada sua sensibilidade ao mel (NZEAKO & HAMDI, 2000; LUSBY *et al.*, 2005; VARGAS, 2006; KUÇUK *et al.* 2007). Trata-se de um microrganismo de importância médica, uma vez que se tornou uma das principais causas de infecção em feridas, septicemia e infecções nasocomiais, devido, principalmente, à resistência aos diversos antibióticos empregados no setor hospitalar (ADELMANN, 2005; COOPER, 2007). Destaca-se, ainda, o uso clínico do mel na erradicação de *S. aureus* metilicina resistente (SAMR) (colonizador de feridas crônicas) (COOPER, 2007).

Avaliando-se a atividade de méis produzidos por *A. mellifera* e *T. angustula* (Meliponinae), nos Estados de Minas Gerais e do Paraná, contra *S. aureus*, verificou-se que a concentração inibitória mínima (CIM) variou de 126,23 a 185,70 mg.mL⁻¹ para o mel de abelha africanizada, e entre 142,87 e 214,33 mg. mL⁻¹ para o mel de *T. angustula* (MIORIN *et al.*, 2003).

Um dos fatores de virulência de microrganismos patogênicos é a capacidade de adesão, pré-requisito para a instalação de uma infecção intestinal (TRABULSI & ALTHERTUM, 2004). Alnaqdy *et al.* (2005) observaram o efeito inibitório *in vitro* do mel na aderência de *S. enteritidis* a células epiteliais intestinais, verificando que diluições superiores a 1:8 reduziram a aderência das bactérias de $25,6 \pm 6,5$ (controle) para $6,7 \pm 3,3$ por célula epitelial ($P < 0,001$).

Como o pH do mel varia entre 3,2 e 4,5, principalmente devido à presença do ácido glucônico, este não favorece o desenvolvimento da maioria das bactérias, cujo pH ótimo varia de 7,2 a 7,4 (MACEDO, 2007).

A utilização oral de mel por pacientes com infecções gastrointestinais (como gastrites, úlcera gástrica causada por bactérias e rotavírus) foi relatada por Somal *et al.* (1994). *Helicobacter pylori*, por exemplo, é uma bactéria Gram negativa patogênica, comumente associada ao desenvolvimento de úlceras gastrointestinais e, em estado crônico, pode levar ao desenvolvimento de carcinomas de origem gastrointestinal. Estudos realizados por Somal *et al.* (1994), Osato *et al.* (1999) e Kuçuk *et al.* (2007), concluíram que o mel de *A. mellifera* mesmo diluído até 15 % apresenta efeito inibitório contra esse microrganismo *in vitro*. Segundo Osato *et al.* (1999), a osmolaridade o principal fator inibidor nos méis analisados.

Estudos realizados por Demera & Angert (2004) compararam a atividade antimicrobiana *in vitro* de méis de *A. mellifera* e *T. angustula* (Meliponinae), produzidos na Costa Rica contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, não foi observada diferença significativa na ação desses méis.

Diferentes soluções aquosas de mel australiano de diversos tipos florais foram testados (0,1%, 1%, 5%, 10% e 20%) contra microrganismos patogênicos, entre eles *C. albicans*, *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *Salmonella californica*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, observando-se que concentrações maiores que 5% foram eficientes, exceto contra *C. albicans* e *S. marcescens* (LUSBY *et al.*, 2005).

Al-Mughrab (2003), avaliando a atividade antifúngica de mel contra fitopatógenos, observou que *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium solani* e *Colletotrichum* sp. foram sensíveis a uma solução aquosa contendo 1 mg de mel. L⁻¹. A concentração testada desse mel foi altamente eficaz

contra o fungo *A. solani*, cuja inibição foi $42 \pm 4,3$ %, já o *P. infestans*, apresentou inibição de $38,2 \pm 3,3$ %. No entanto, as espécies *S. solani* e *Colletotrichum* sp. foram menos sensíveis à solução de mel testada.

Muitos compostos antimicrobianos têm sido identificados a partir de méis de diferentes origens florais. Mel de manuka (*Leptospermum scoparium*), espécie vegetal nativa da Nova Zelândia, tem uma forte atividade antibacteriana não associada ao peróxido de hidrogênio (ALLEN *et al.*, 1991; WESTON *et al.*, 2000). Segundo Russel (1983), citado por Al-Mamary *et al.*, (2002), os compostos com atividade antimicrobiana isolados nesses méis de manuka são o metil 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato e metil 3,4,5-trimetoxibenzoato, conferindo-lhe, assim, um diferencial terapêutico. Além disso, Weston *et al.* (1999) identificaram os flavonóides pinobanksina, pinocembrina, chrisina e galangina em mel dessa planta, atribuindo a eles, independentemente de serem originários de néctar, pólen e própolis, a responsabilidade parcial nessa ação.

3.3.5 – QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE MEL

A análise de microrganismos em mel pode indicar a qualidade higiênico-sanitária do processamento, desde a coleta das melgueiras no campo até o envase do produto na indústria ou casa de mel (SNOWDON & CLIVER, 1996).

A legislação em vigor sobre o mel brasileiro, não estabelece nenhum parâmetro específico de qualidade microbiológica, exceto que o alimento seja manipulado com Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 2000).

Os microrganismos de interesse à indústria de processamento de mel são aqueles que toleram o alto potencial osmótico, devido à alta concentração de glicídios, o baixo pH e as substâncias antimicrobianas, como o peróxido de hidrogênio e ácidos fenólicos (BOGDANOV, 1997; SNOWDON & CLIVER, 1996).

Segundo Snowdon & Cliver (1996), a contaminação do mel pode ser primária, resultante da contaminação ambiente do apiário, onde ocorre naturalmente sem a intervenção humana e é difícil de ser controlada, ou secundária, durante ou após a coleta do mel, sendo decorrente das etapas de beneficiamento, podendo dever-se a falta de higiene do manipulador, contaminação cruzada, equipamentos e instalações do local de extração não higienizados, podendo ser controlada por programas de controle de qualidade, como implantação de BPF.

As características físico-químicas do mel o fazem um meio apropriado para a sobrevivência de esporos de microrganismos, em especial esporos de *Clostridium*

botulinum (IURLINA *et al.*, 2006). Fatores como néctares das flores, pólen, vento, poeira e trato intestinal das abelhas estão envolvidos na contaminação, por espécies de *Clostridium*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (SNOWDON & CLIVER, 1996).

As características físico-químicas do mel o fazem um meio apropriado para a sobrevivência de esporos de microrganismos, em especial esporos de *Clostridium botulinum* (IURLINA *et al.*, 2006; KÜPLÜLU *et al.*, 2006).

A pesquisa do grupo de bactérias esporuladas presentes no mel reveste-se de importância desde 1976, quando o botulismo infantil, doença neurológica grave, não contagiosa, foi identificado nos EUA em crianças menores de um ano de idade como uma entidade clínica resultante da colonização intestinal e da produção de toxina por *C. botulinum*, adquirido após a ingestão de mel (IURLINA & FRITZ, 2005; NEVAS *et al.*, 2005; RALL *et al.*, 2005; KÜPLÜLU *et al.*, 2006; RAGAZANI *et al.*, 2008).

Evidências atuais indicam que o botulismo intestinal ocorre com maior frequência em crianças com idade entre 3 e 26 semanas, cuja flora intestinal ainda não está totalmente formada. Por isso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda aos pais para que evitem servir mel às crianças com menos de 1 ano de idade, apesar de não haver confirmação de casos da doença no Brasil (RAGAZANI *et al.*, 2008).

Como o *C. botulinum* está amplamente distribuído no meio-ambiente, a contaminação do mel pode ocorrer a partir do néctar e pólen, pela própria abelha, ar, etc. Nesses casos não existe forma de evitar a contaminação, e por ser resistente ao calor, a pasteurização do mel não elimina o *C. botulinum*. Somente temperaturas superiores a 100°C podem afetar o agente causador do botulismo, e aquecer o mel a essa temperatura destrói suas propriedades físico-químicas (SNOWDON & CLIVER, 1996; RALL *et al.*, 2005; RAGAZANI *et al.*, 2008).

Fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium* e *Mucor*, bem como os leveduriformes *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torula*, também predominam em méis contaminados (FINOLA *et al.*, 2006).

Rall *et al.* (2003) analisaram 100 amostras de méis de diversas cidades do Estado de São Paulo, 77 industrializadas e 23 de produção doméstica, e observaram que 25% delas excederam o nível aceitável de contagem de bolores e leveduras que é de 10^2 (FINOLA *et al.*, 2006). Análises de Barros *et al.* (2002) com amostras de méis comercializados no Recife (PE) e obtidas em supermercados e feiras livres apresentaram máximo de UFC de bolores e leveduras de 5×10^2 para méis artesanais e de 5×10^3 para méis industriais, identificando *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*, além de *Candida* e *Rhodotorula*.

4. METODOLOGIA

4.1. Mesorregiões do Estado de Alagoas e Municípios em Estudo

O Estado de Alagoas apresenta seis mesorregiões apícolas (Figura 12) conforme a influência de diferentes fatores na composição do mel, como vegetação, clima, umidade relativa do ar, temperatura, etc (SOUZA, 2004).

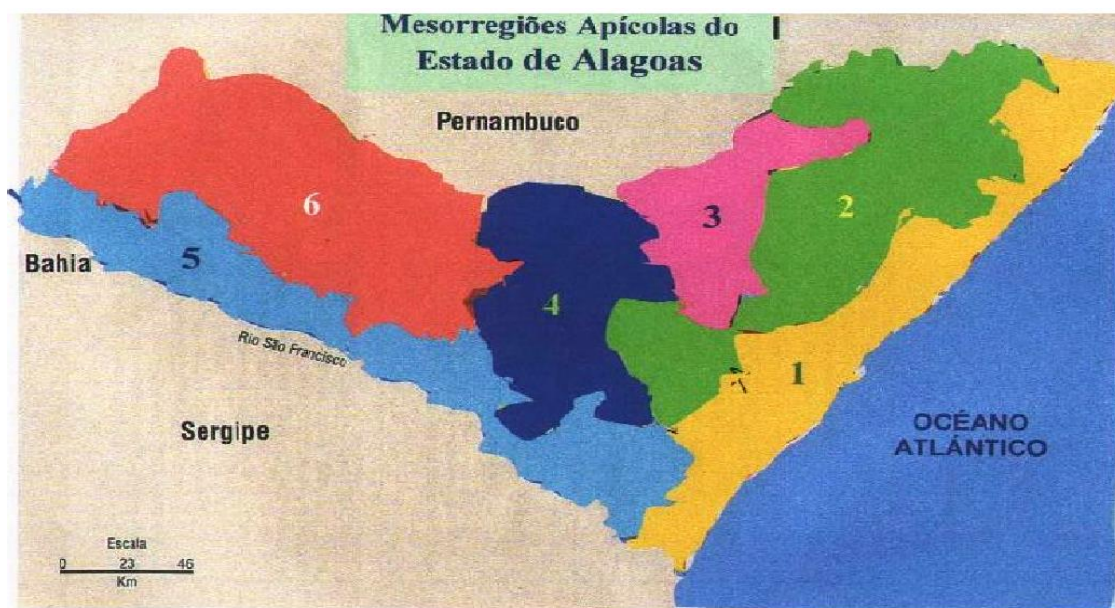


FIGURA 12 – Mesorregiões Apícolas do Estado de Alagoas. 1 – Litoral; 2 – Região canavieira; 3 – Mata Atlântica; 4 – Agreste; 5 – Baixo São Francisco; 6 – Semi-Árido. Fonte: Souza (2004).

A mesorregião 1 é caracterizada por relevo de planície litorânea, clima tropical, temperatura entre 22 e 29 °C, com chuvas regulares e vegetação com predomínio de mangues e coqueirais, enquanto a mesorregião 2, de tabuleiro, apresenta relevo plano ou pouco ondulado, clima tropical, temperatura entre 22 e 30 °C, chuvas regulares, e vegetação com predomínio de cana-de-açúcar, onde destaca-se a produção de mel de melato, o qual apresenta baixo valor comercial devido principalmente à cor escura. Tal mesorregião apresenta, ainda, áreas de preservação de mata atlântica em encostas e matas-ciliares. A mesorregião 3, de mata, apresenta relevo fortemente ondulado, com clima tropical, temperaturas entre 22 e 35 °C, chuvas regulares e vegetação com áreas de preservação de mata Atlântica, matas ciliares, pasto e capoeiras. Já a mesorregião 4, ou Agreste, apresenta relevo plano ou ondulado, clima tropical, temperatura entre 31 e 38 °C, chuvas irregulares e vegetação de transição entre a mata e o semi-árido, destacando-se a

fruticultura em pequenas propriedades. As mesorregiões 5 e 6 são caracterizadas pela vegetação de caatinga predominante. No entanto, a mesorregião 5, pela localização a margem do rio São Francisco, apresenta alguns aspectos diferenciados, principalmente umidade relativa do ar e temperatura. Segundo Souza (2004), a faixa de temperatura na região do São Francisco varia de 22 a 32 °C, enquanto que na região do Semi-Árido oscila de 20 a 39 °C.

As 43 amostras de mel de diferentes abelhas [14 de *Apis mellifera* (M), 22 de *M. scutellaris* (AU), três de *M. quadrifasciata* (AM), duas de *M. subnitida* (AJ) e duas de *Plebeia* sp (AP)], foram coletadas, durante a estação das secas 2008/09, nos municípios (Figura 13) de Delmiro Gouveia (sertão, região do São Francisco), Palmeira dos Índios (agreste), Viçosa e Mar Vermelho (região de mata Atlântica), Ibateguara e Colônia Leopoldina (região de cana), e Barra de Santo Antônio, Barra de São Miguel e Marechal Deodoro (litoral). Em cada local de coleta foi instalado um pluviômetro para acompanhamento da precipitação durante o período em estudo.

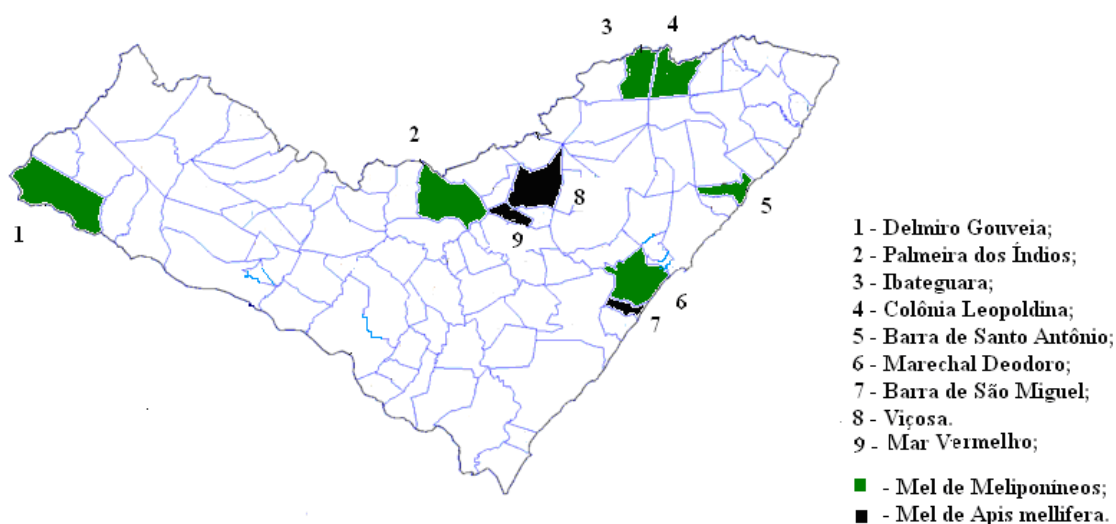


FIGURA 13 – Mapa ilustrativo dos municípios onde foram realizadas as coletas das amostras de méis de abelhas nativas [em verde 1-6; AU: Uruçú (*M. scutellaris*), AM: Mandaçaia (*M. quadrifasciata*), AJ: Jandaíra (*M. subnitida*), AP: Plebéia (*Plebeia* sp)] e africanizadas (em preto 7-9, M: *Apis mellifera*), representativos de diferentes mesorregiões apícolas do Estado de Alagoas. Delmiro Gouveia (AM1-AM3, AJ1-AJ2, AP1-AP2), Palmeira dos Índios (AU4, AU14-AU22), Colônia Leopoldina (AU8-AU10), Ibateguara (AU5-AU7), Barra de Santo Antônio (AU1, AU3, AU11, AU12), Marechal Deodoro (AU13), Barra de São Miguel (M13), Viçosa (M3, M8, M11, M14) e Mar Vermelho (M9, M10).

Os méis de abelhas nativas foram coletados em meliponários particulares (Figuras 14, 15 e 16), estando os ninhos acondicionados em ocos de troncos de árvores (Figura 17), da forma como foram capturados na natureza, e caixa racional padrão (Figura 18). As coletas foram realizadas com auxílio de seringas estéreis descartáveis (Figura 19). As amostras de mel dessas abelhas foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo, ao laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA) do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).



FIGURA 14 – Aspecto da criação de *Melipona scutellaris* (uruçu) em tronco de árvores capturados da natureza, nos municípios alagoanos de: a) Ibataguara (região canavieira); b) Palmeira dos Índios (agreste).



FIGURA 15 – Aspecto da criação de *Melipona scutellaris* (uruçu) em caixas de cultivo racional, no Município de Barra de Santo Antônio (litoral de Alagoas).



FIGURA 16 – Aspecto da criação de meliponíneos (*M. quadrifasciata*; *M. subnitida* e *Plebeia* sp) acondicionados em caixas racionais de cultivo no município alagoano de Delmiro Gouveia (sertão, região do São Francisco).

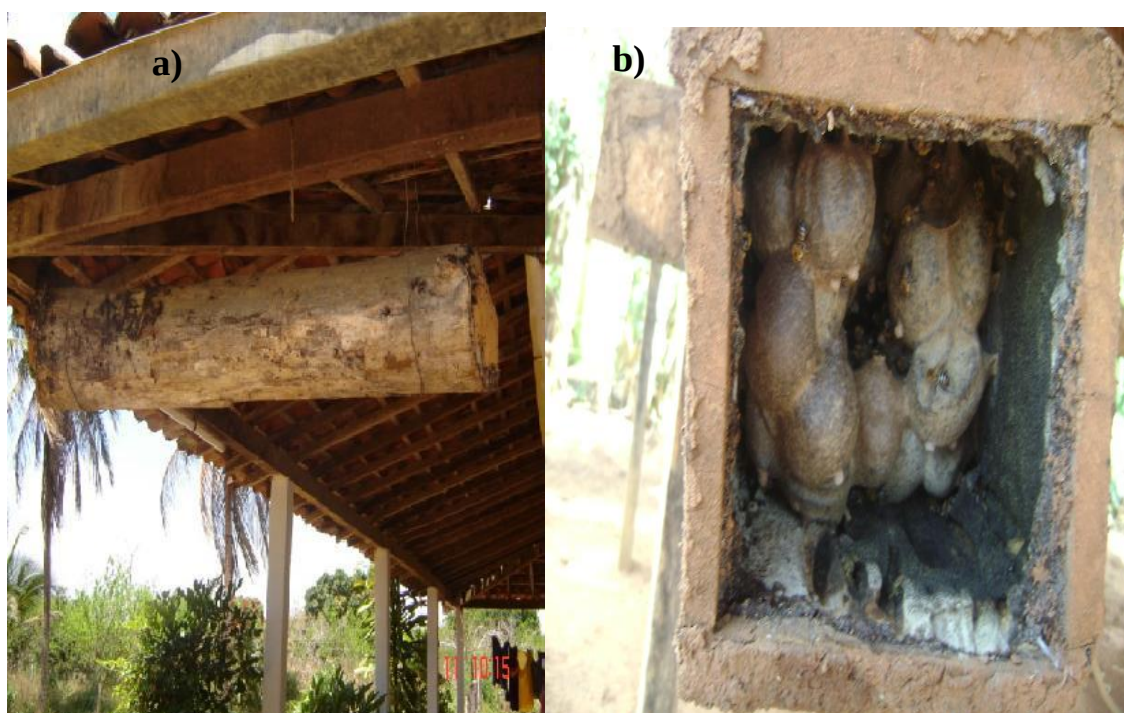


FIGURA 17 – Ninho de *Melipona scutellaris* (abelha uruçú) em oco de tronco (a), formato dos potes de mel armazenado (b), em meliponário do município de Palmeira dos Índios (agreste alagoano).

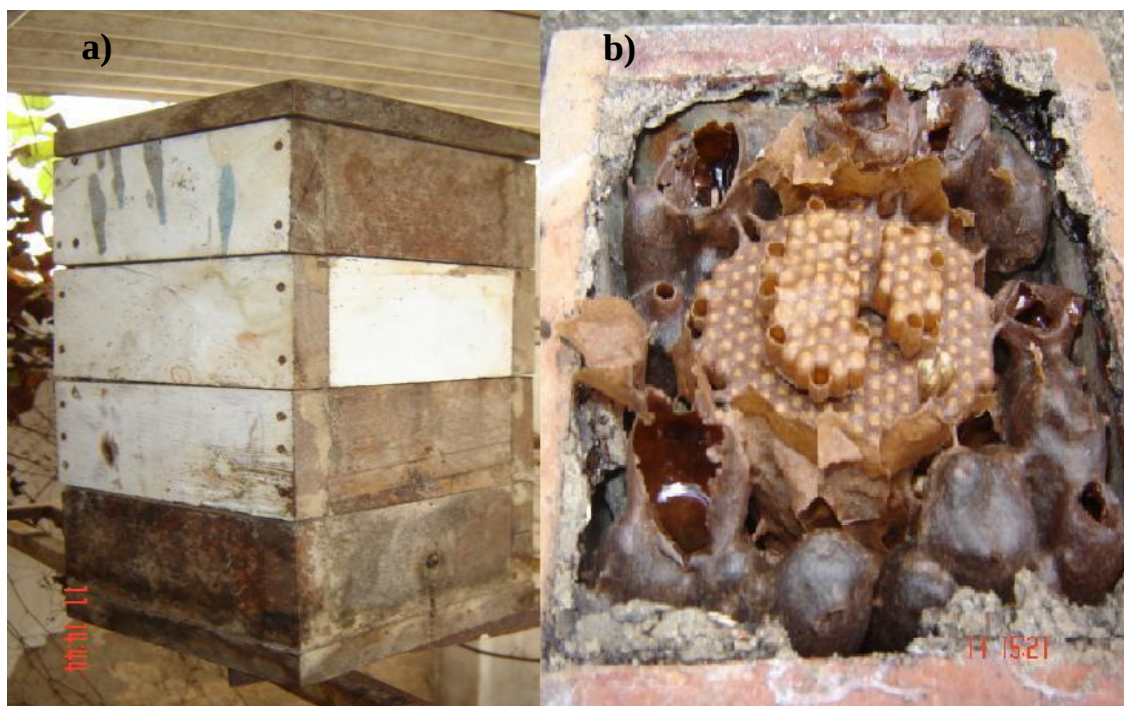


FIGURA 18 – Ninho de *Melipona quadrifasciata* (abelha mandaçaia) em caixa padrão (a) e estrutura do ninho (b) em meliponário do município alagoano de Delmiro Gouveia (sertão, região do São Francisco).



FIGURA 19 – Colônia de *M. scutellaris*, (a) e (b) coleta de mel com auxílio de seringa esterilizada descartável no município alagoano de Palmeira dos Índios (agreste).

Por outro lado, os méis de *A. mellifera* foram coletados em apiários experimentais (Figura 20) instalados nos municípios alagoanos de Barra de São Miguel (litoral) e Viçosa (zona da mata Atlântica). Após a centrifugação desses méis no local de beneficiamento (casa de mel dos apiários experimentais), os mesmos foram transportados em caixas isotérmicas contendo gelo, ao LBPVMA/IQB/UFAL para decantação e análises.



FIGURA 20 – Apiário experimental instalado no município de Barra de São Miguel - AL.

Foram, ainda, avaliados méis de *A. mellifera* comerciais do tipo “blend” (mistura de méis de diferentes apiários) obtidos de produtores do Estado de Alagoas.

4.2. Local de Análise das Amostras de Mel

As análises físico-químicas e microbiológicas dos méis coletados foram realizadas no LBPMA, IQB, situado no campus A.C. Simões da UFAL. Todas foram realizadas em triplicatas e reproduzidas pelo menos três vezes.

4.3. Análises físico-químicas dos diferentes méis de abelhas

4.3.1 – Determinação de umidade

A umidade dos méis foi determinada por refratometria, conforme método nº 969.38b (AOAC, 1997) indicado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2000). Consiste na medida do índice de refração do mel a 20 °C, que é convertido para teor de umidade através de tabela de referência, a qual fornece a concentração de água como uma função do índice de refração.

4.3.2 – Condutividade elétrica

A condutividade elétrica dos méis foi determinada pelo método descrito por Bogdanov (2002), utilizando-se uma solução de mel a 20%.

4.3.3 – Determinação de pH e acidez

Utilizou-se um pHmetro previamente calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0 e, em seguida, pesou-se 2,0 g de mel e solubilizou-se a mesma em 15 mL de água deionizada. Essa mesma solução foi utilizada para determinação da acidez, sendo adicionadas cerca de 50 µL de solução de fenolftaleína 1% e, em seguida, efetuada a titulação com NaOH 0,05 M até o ponto de viragem (coloração rósea persistente por 10 segundos), conforme Vargas (2006).

Para o cálculo foi utilizada a fórmula:

$$\text{Acidez livre} = \frac{\text{Volume gasto} \times \text{Molaridade (NaOH)} \times \text{Fator de correção (NaOH)} \times 1000}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

Para padronização da solução de hidróxido de sódio 0,05 M, pesou-se aproximadamente 50 mg de biftalato de potássio $[\text{C}_6\text{H}_4(\text{CO}_2\text{H})(\text{CO}_2\text{K})]$ e secou-se em estufa a 105 °C durante 1 h. Em um frasco Erlenmeyer (125 mL), adicionou-se 50 mL de água deionizada. Após solubilização, adicionou-se cerca de 50 µL de solução alcoólica de fenolftaleína 1%. Titulou-se a solução de NaOH com biftalato de potássio até o aparecimento de uma leve coloração rosada.

Cálculo do fator de correção (f) :

$$f = \frac{p}{0,2042 * V * N}, \text{ sendo que:}$$

p = gramas de biftalato de potássio usado na titulação

V = volume em mL da solução de NaOH gasto na titulação

M = molaridade da solução de NaOH

4.3.4 – Determinação de Proteínas Totais

Para quantificação do teor de proteínas totais e visualização do perfil protéico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), realizou-se uma extração prévia por precipitação ácida. Solubilizou-se 2,5 g de mel em 7,5 mL de água, e acidificou-se com

HCl 32 % até pH 2. As amostras acidificadas foram mantidas na geladeira por 24 h para facilitar a precipitação e depois centrifugada a 3.800 g por 15 min (OLIVEIRA, 2006).

O precipitado foi ressuspenso em 7,5 mL de uma solução de clorofórmio-metanol (2:1 v.v⁻¹). Os frascos contendo a solução foram submetidos à agitação oscilatória (250 rpm) por 15 min à temperatura ambiente (OLIVEIRA, 2006).

Após a extração, a solução foi centrifugada novamente (3.800 g, 15 min) e o sobrenadante foi avaliado para quantificação pelo método de Lowry. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com ligações peptídicas de proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm (LOWRY *et al.*, 1951; ZAIA *et al.*, 1998).

Foram preparados previamente os seguintes reagentes:

- **Solução estoque padrão de BSA (albumina de soro bovina):** 100 mg em 1000 mL de solução salina (cloreto de sódio à 0,9 %). Essa solução foi diluída para concentrações de 50, 40, 30, 20 e 10 µg.mL⁻¹.
- **Solução A (200 mL):** solução de sulfato de cobre (1%) (2,0 mL) + solução de tartarato de sódio e potássio (0,1 N) (2,0 mL) + 196 mL de solução hidróxido de sódio (0,1 N) em de carbonato de sódio (2%). A solução de sulfato de cobre só deve ser adicionada na solução de carbonato de sódio + NaOH no momento em que as amostras forem utilizadas.
- **Solução B:** Solução de Folin Ciocalteu (diluição em água deionizada 1:1 v:v)

Assim, depositou-se um volume de 2,0 mL da solução A em tubos de ensaios contendo alíquotas de 500 µL do sobrenadante final do procedimento de extração, ou da solução padrão de BSA (de cada concentração), sempre sob agitação. Após 10 min à temperatura ambiente ($\cong$ 25°C), adicionou-se 200 µL da solução B às misturas de reação. Passados 30 min de repouso, as absorvâncias dessas misturas foram lidas em espectrofotômetro a 660 nm.

Para visualização do perfil protéico em CCD, 10 µL do extrato protéico de cada amostra de mel foi aplicado em cromatoplaça de alumínio coberta com sílica (0,25 mm de espessura) e com indicador para fluorescência (Merck, 60 F₂₅₄). Os cromatografias foram desenvolvidas no sistema de solventes clorofórmio: metanol (65:25 v:v), sendo reveladas

com solução de ninidrina 7,5 % em metanol e acetona (1:1 v:v), seguida por aquecimento a 105 °C (5 min).

4.3.5 – Determinação da concentração de prolina

Para quantificação de prolina, principal aminoácido presente em mel, foi utilizada a metodologia descrita por Bogdanov (2002).

Para tanto, preparou-se uma solução aquosa de mel (50 mg.mL⁻¹) e uma solução aquosa para o padrão de prolina (0.4 mg.mL⁻¹). A solução estoque de prolina foi diluída inicialmente 4 X, e esta, em seguida, diluída, 2, 4, 8 e 16 X, gerando concentrações de 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg.mL⁻¹. Em seguida, depositou-se 500 µL dessas soluções em tubos de ensaio nos quais adicionou-se 1 mL de ácido fórmico 98% e 1 mL de solução ninidrina em etileno monometil-éter glicol 3% (m: v). Os tubos de ensaio foram agitados por cerca de 3 min e transferidos para banho Maria a 100°C, durante 15 min, e 70 °C, durante 10 min. Imediatamente após, adicionou-se 5 mL da solução aquosa de 2-propanol 50% e aguardou-se 45 min até que as misturas de reação fossem submetidas a espectrofotômetro para leitura das absorvâncias a 510 nm. O resultado foi expresso em equivalentes mg de prolina . Kg⁻¹ de mel, onde a curva padrão de prolina (Apêndice 2) apresentou R²= 0,999.

Para avaliação qualitativa deste aminoácido nos diferentes méis, testou-se dois sistemas de extração de aminoácidos livres, sendo um direto, empregando hidrólise ácida (BOGDANOV, 2002), e outro a partir de extratos protéicos de mel, obtidos para quantificação de proteínas totais. Para tanto, alíquotas de 25 µL das extratos aquosos hidrolisados em ácido fórmico foram aplicadas em cromatoplasas de alumínio coberta com sílica (0,25 mm de espessura) e contendo indicador para fluorescência (Merck, 60 F₂₅₄). As cromatografias foram desenvolvidas no sistema de solventes butanol: ácido acético: água (4:1:1 v:v:v) clorofórmio: metanol (65:25 v:v), sendo reveladas com solução de ninidrina 7,5 % em etanol e acetona (1:1 v:v), seguida por aquecimento a 105 °C (5 min).

4.3.6 - Atividade diastásica

A ocorrência de diferenças florais e entomológicas dos méis sugere diferença da atividade da diastásica (SANTOS *et al.*, 2003). O método espectrofotométrico de determinação dessa enzima foi descrito por Bogdanov (2002) e modificado por Santos *et al.*(2003). Consiste inicialmente em misturar uma solução de amido com iodo, sendo que este tem afinidade pelas ligações glicosídicas e tinge de roxo a solução. A diastase, por

outro lado, cliva tais ligações, e o método baseia-se na descoloração de tal mistura por mel. Quanto mais rápida a descoloração, maior a atividade enzimática da amostra - expressa em unidade de escala Gothe ou Shade por grama de mel. A unidade Gothe é definida como a quantidade de enzima capaz de converter 0,01 g de amido em glicose durante uma hora (SANTOS *et al.*, 2003; VARGAS, 2006).

Para tanto, foram preparados previamente os seguintes reagentes:

- Solução de Amido 1% – solubilizou-se 1g de amido solúvel anidro em 90 mL de água morna contida em balão volumétrico (100 mL), e levou-se à ebulição sob agitação constante, por 3 min. Após o resfriamento, completou-se o volume para 100 mL com água deionizada;
- Solução Estoque de Iodo – Preparou-se uma solução de iodo ressublimado em iodeto de potássio 0,02M;
- Solução Tampão de acetato pH 5,3 (0,1 M);
- Solução de Cloreto de Sódio 0,1 M.

Para preparo da solução estoque de mel, diluiu-se 5 g de mel em cerca de 20 mL de água deionizada. Homogeneizou-se o máximo possível com auxílio de bastão de vidro e adicionou-se NaOH 0,05 M em volume suficiente para que a solução atingisse pH=5,3. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água deionizada até a marca de aferição.

A seguir, acondicionou-se um tubo de ensaio com tampa (130 mm X 15 mm) em uma grade suporte em banho-Maria a 40 °C, e a ele adicionou-se 5mL da solução estoque de mel, 500 µL de tampão acetato 0,1 M (pH=5,3), 500 µL da solução de cloreto de sódio 0,1 M, 150 µL da solução de iodo 0,02M e 9,6 mL de água deionizada. Em seguida, adicionou-se 250 µL de solução de amido 1% (m/v). O volume final da mistura de reação foi de 16 mL. Após homogeneização em agitador de tubos, acionou-se o cronômetro, e realizando-se a leitura de absorbância inicial em espectrofotômetro a 660 nm. A cada 5 min, efetuou-se nova leitura da avsorvância, até que esta fosse de 0,240 e 0,200. Após cada leitura, as amostras foram retornadas ao banho-maria à temperatura de 40 °C. O cálculo da atividade diastásica (A.D) se dá através da utilização da fórmula:

$$AD = \frac{\Delta A_{660} \times 0,3}{t (h) \times m (g) \times V (L)}$$

sendo que:

AD = atividade diastásica (U.g^{-1} de mel, onde U = unidade na escala Gothe);

ΔA_{660} = diferença das absorvâncias inicial e final;

0,3 = constante de absorvidade (previamente determinado em ensaio sem mel);

t (h) = tempo (h) que a enzima leva desde a leitura inicial até a leitura entre 0,240 e 0,200;

m (g) = massa de mel em solução 5 (g);

V (L) = volume total do sistema em reação (0,016L).

4.3.7 – Determinação de glicídios redutores, glicídios totais e sacarose

Foi utilizado o método de “Lane e Eynon” descrito por Vargas (2006), cujo princípio é baseado na redução da solução de Fehling, sulfato de cobre (CuSO_4) e de tartarato duplo de sódio e de potássio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$), respectivamente, Fehling A e Fehling B, durante a titulação no ponto de ebulição, com uma solução de glicídeos redutores do mel (BOGDANOV, 2002).

4.3.8 – Determinação de hidroximetilfurfural

Para quantificação do teor de hidroximetilfurfural, os seguintes reagentes foram preparados:

- Solução de Carrez I : 15 g de ferrocianeto de potássio – $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água deionizada;
- Solução de Carrez II : 30 g de acetato de zinco – $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água deionizada;
- Solução de bissulfito de sódio – NaHSO_3 a 0,2% .

A 5 g de mel acrescentou-se 25 mL de água deionizada e homogeneizou-se com ajuda de um bastão de vidro. Transferiu-se esse material para um balão volumétrico e completou-se o volume para 50 mL com água deionizada. Adicionou-se, então, 0,5 mL da solução de Carrez I, e 0,5 mL da solução de Carrez II. A mistura foi, então filtrada através de papel de filtro preparativo, descartando os primeiros 10 mL do filtrado. Em seguida, depositou-se 5 mL do filtrado em dois tubos de ensaio, adicionando 5 mL de água em um deles chamado “amostra” e 5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2% no outro (chamado “referência”), levando-se ambos para o agitador de tubos por cerca de 1 min. Determinou-se a absorvância das amostras a 284 e 336 nm.

4.3.9 - Determinação de Cor

A coloração do mel é expressa em mm Pfund (Quadro 3). A cor do mel está

diretamente relacionada à sua origem botânica, processamento, armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo de néctar, temperatura a qual o mel amadurece na colméia e teor de cinzas (NORONHA, 1997; VARGAS, 2006). Para determinação colorimétrica, utilizou-se o método de Bianchi (1981), descrito por Vargas (2006). Este consiste na leitura espectrofotométrica de uma solução aquosa de mel 50% (m:v) a 635 nm. A cor do mel é expressa em mm Pfund, através da fórmula: $Cor = (371.39 * Abs_{635}) - 38.7$.

QUADRO 3 – Classificação do mel conforme a cor.

Coloração do Mel Conversão da Abs	Branco Água	Extra Branco	Branco	Âmbar Extra Claro	Âmbar Claro	Âmbar	Âmbar Escuro
Abs_{635 nm}	0,104 – 0,125	0,125 – 0,148	0,148 – 0,195	0,195 – 0,238	0,238 – 0,333	0,333 – 411	> 411
mm Pfund	0 - 8	8 - 16.5	16.5 - 34	34 - 50	50 - 85	85 - 114	> 114

4.4. Perfil Antioxidante dos Méis de diferentes Abelhas

4.4.1 – Conteúdo de fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais foi avaliado por espectrofotometria, empregando o reagente Folin-Ciocalteu, método desenvolvido por Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos (1999), modificado por Meda *et al.* (2005). Cada amostra de mel (1 g) foi diluída em 10 mL de água deionizada. Em seguida, a solução foi filtrada em papel de filtro preparativo, e a uma alíquota de 0,2 mL desta acrescentou-se 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu 0,02 M sob agitação. Após 5 min, adicionou-se 0,8 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5%. Após 2 h de repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada a 760 nm. A solução aquosa de ácido gálico (0 – 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$) foi utilizada como padrão (Apêndice 2), e o resultado expresso em Eq. mg de ácido gálico $\cdot 100 g^{-1}$ de mel (KUÇUK *et al.*, 2007; MEDA *et al.*, 2005).

4.4.2 – Conteúdo de flavonóides totais

O teor de flavonóides totais foi determinado por espectrofotometria, conforme descrito por Blasa *et al.* (2005), citados por Al *et al.* (2009). Ao volume de 1 mL de solução metanólica de mel (100 $mg \cdot mL^{-1}$), acrescentou-se 0,3 mL de $NaNO_2$ 5%. Após 5 min, adicionou-se 0,3 mL $AlCl_3$ 10% e aguardou-se 6 min para neutralização com 2 mL de NaOH (1 M). A absorvância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro a 510 nm, utilizando-se como curva-padrão (Apêndice 2) as respostas de diferentes concentrações de

solução metanólica de quercetina ($0 - 120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4.4.3 – Atividade antioxidante pelo emprego do radical DPPH

A atividade antioxidante foi determinada segundo metodologia desenvolvida por Chen *et al.* (2000), modificada por Meda *et al.* (2005), empregando $6,5 \times 10^{-5}$ M do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (Figura 5). Assim, cada amostra de mel foi diluída em metanol ($40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e, em seguida, 0,75 mL de cada diluição foi acrescida de 1,5 mL de solução metanólica de DPPH ($0,02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Após 15 min de reação, efetuou-se a leitura da absorvância (517 nm) das misturas contra o controle (0,75 mL de solução aquosa de mel acrescida de 1,5 mL de metanol). As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em equivalentes μg de quercetina ou de ácido gálico, os quais são utilizados como antioxidantes, por mL. Para tanto, foram preparadas duas curvas padrões de soluções metanólicas de quercetina ($0-5,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e de ácido gálico ($0-4,0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4.4.4 – Poder antioxidante de redução de ferro (FRAP)

A atividade antioxidante de redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , foi avaliada conforme metodologia de Oyaizu (1986), descrita por Kuçuk *et al.* (2007). Para tanto, adicionou-se a 2,5 mL de solução aquosa de mel ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 2,5 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6.6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) a 1%. A mistura de reação foi incubada a 50°C por 20 min e, em seguida, adicionou-se 2,5 mL de ácido tricloroacético TCA 10%, sob agitação constante. O material foi, então, centrifugado a 3000 rpm, durante 10 min. Ao volume de 2,5 mL do sobrenadante adicionou-se 2,5 mL de água deionizada e 500 μL de FeCl_3 0,1%, efetuando-se, em seguida, a leitura da absorvância a 700 nm. Os resultados foram expressos como equivalentes mg de ácido gálico. 100 g^{-1} de mel, conforme preparo prévio de curva padrão (Apêndice 2) de ácido gálico ($0-100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4.4.5 Detecção qualitativa de compostos antioxidantes por CCD

Um volume (25 μL) da solução metanólica de mel ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi aplicado em cromatofolhas de alumínio contendo sílica gel 60 ($F_{254 \text{ nm}}$). Soluções estoque ($0,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) dos antioxidantes ácido gálico, quercetina, catequina e rutina foram utilizadas como padrões. A cromatografia foi desenvolvida no sistema de solventes clorofórmio: metanol: propanol: água (6:5:1:4 v:v:v:v). Após observação sob luz visível e Uv (366 e 254 nm), a revelação foi efetuada com soluções metanólicas de DPPH (0,2%) e FeCl_3 (2%), com

reagente de Folin Ciocalteu e vapores de amônia.

4.5. Detecção de esporos de *Clostridium* sp

Para detecção de esporos de *Clostridium* sp em amostras de mel, utilizou-se a metodologia descrita por Ragazani *et al.* (2008). Para tanto, pesou-se assepticamente 10 g. de cada amostra de mel e solubilizou-se as mesmas em 90 mL de água peptonada (0,1%). Transferiu-se 1mL dessa solução diluída de cada amostra para tubos de ensaio contendo 9 mL do meio de cultivo *Cooked Meat Medium* CMM (meio de carne cozida) (Figura 21), ajustando o pH para 7,2 (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1999).

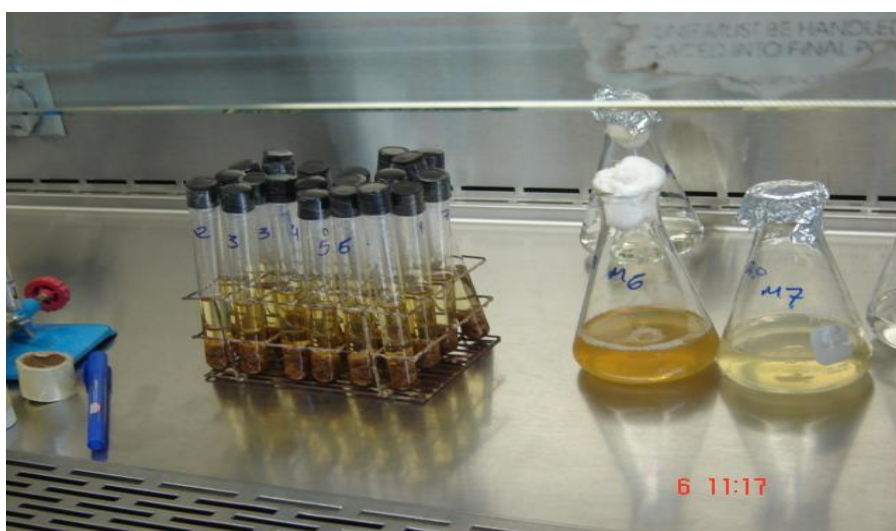


FIGURA 21 – Inoculação da diluição de mel em água peptonada (0,1%) no meio de cultura *Cooked Meat Medium* (CMM).

Os tubos inoculados de CMM foram submetidos a um choque térmico de 80-82°C por 10 min, e resfriados para até cerca de 30 °C em água com gelo. Em seguida foram incubados em jarra de anaerobiose a 37 °C, por um período de 10 dias.

O crescimento bacteriano característico por turvação do meio CMM foi avaliado diariamente. As culturas também foram submetidas a esfregaços e colorações (VERMELHO *et al.*, 2007) pelo método de Gram, rastreando-se bastonetes Gram positivos com esporos terminais e subterminais, e pelo método de Verde Malaquita, monitorando-se a presença de esporos ovais subterminais nesses bastonetes Gram-positivos, os quais são característicos do gênero *Clostridium*.

Tais culturas foram reisoladas em meio Ágar *Reinforced* contido em duas placas de Petri, e estas incubadas sob anaerobiose, por 24-48 h.. As colônias que apresentaram

crescimento típico foram transferidas para tubos contendo meio BHI (caldo de infusão de cérebro e coração) acrescido de 0,5 % de cloridreto de cisteína, sendo estes incubados a 37°C por 24 a 48 h. Após esse período, realizou-se novos esfregaços corados pelo método de Gram, além da prova de detecção de catalase (VERMELHO *et al.*, 2007), para diferenciar os gêneros *Clostridium* e *Bacillus* porventura presentes.

Posteriormente, os microrganismos isolados foram inoculados no sistema comercial de identificação rápida API-Staph (Biomerieux, França), o qual contém 20 microtubos com substratos desidratados para avaliação de 20 provas diferentes (fermentação/oxidação dos glicídios glicose, maltose, lactose, sacarose e salicina, atividade da lecitinase, urease, protease, gelatinase, nitrato-redutase, produção de indol, teste da motilidade e hemólise. Assim, na caixa de incubação previamente identificada, distribuiu-se cerca de 5 mL de água destilada esterilizada nos alvéolos, para criar uma atmosfera úmida. Coletou-se, então, com o auxílio de uma alça de platina, uma colônia de cada isolado (24 h). Esta foi depositada em 5 mL de água destilada esterilizada, agitando-se para a obtenção da suspensão de células. A galeria API foi depositada na caixa de incubação e, com o auxílio de uma micropipeta, a suspensão dos microrganismos (200 µL) foi inoculada, até o nível recomendado, nos 20 microtubos (Figura 22). Finalmente, o conjunto foi incubado a 37 °C, por 24 h. As leituras foram traduzidas por alterações de cor ou reveladas pela adição de reagentes específicos do *kit* API. Foi gerado um código numérico de 7 dígitos que corresponde à espécie identificada pelo programa de identificação do APILAB Plus (versão 3.3.3.@copyright 1990 biomerieux sa).



FIGURA 22 – Inoculação da suspensão de microrganismos nas galerias do sistema API para sua identificação através das respostas bioquímicas.

4.6 – Atividade antibacteriana dos diferentes méis de abelhas

Foram alvos da determinação da atividade antimicrobiana, as espécies bacterianas: *Escherichia coli*, *Salmonella* Tiphymurium, isoladas a partir de alimentos contaminados e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FANUT, e *Helicobacter pylori* ATCC 43504, adquirida na Fundação Oswald Cruz (RJ).

Para determinação da atividade antimicrobiana foi utilizado o método descrito por Macedo (2007). Foram, então, utilizadas duas diferentes concentrações de solução aquosa de mel (15 % e 25 %) filtrado (membrana Sartorius 0,22 μm). Para padronização do inóculo bacteriano, utilizou-se a escala 4 de MacFarland equivalente a $12 \cdot 10^8$ células.mL⁻¹.

Como meio de cultura, utilizou-se o Ágar Nutriente (AN), cuja composição é: 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g de NaCl e 15 g de ágar bacteriológico e 1 L de água deionizada, sendo esterilizado a 121 °C, 1 atm por 20 min. Após o resfriamento do meio (200 mL) para cerca de 45 °C, adicionou-se 1 mL da suspensão bacteriana de concentração pré-estabelecida, homogeneizou-se essa mistura e imediatamente verteu-se em placas de Petri esterilizadas (cerca de 20 mL por placa). Após solidificação, com auxílio de um furador esterilizado, perfurou-se dois orifícios eqüidistantes das bordas, cada um com cerca de 8 mm de diâmetro. Em seguida, esses foram preenchidos com 100 μL da solução aquosa de mel em cada concentração.

As placas foram mantidas sob refrigeração por 12 h, para dispersar as soluções de mel no ágar e, em seguida, foram incubadas por 24 h a 30 ± 1 °C, para *E. coli* e *S. Tiphymurium* e a 37 °C para *H. pylori*. O halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor de cada disco foi determinado com o auxílio de paquímetro de 0,05 mm de precisão.

Para os controles positivos, foram utilizados discos contendo cinco antibióticos: Ampicilina 10 μg , Vancomicina 30 μg , Ofloxacina 10 μg , Noflaxacina 10 μg e Cotrimoxazol 25 μg , como controle negativo utilizou-se água estéril.

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, sendo o experimento fatorial, testando-se diferentes soluções (água destilada estéril, discos de antibióticos de ampicilina, vancomincina, ofloxacina, norfloxaxina e cotrimoxazol, e soluções 15 e 25% das amostras de mel estéreis diluídas e cultura de microrganismos).

4.7 – Atividade Antifúngica dos méis de nativas e africanizadas

Os fungos filamentosos termorresistentes *Byssochlamys fulva* (CCT 0056), *Neosartorya fischeri* (CCT 3491) e *Talaromyces flavus* (CCT 4683), adquiridos da Coleção de Culturas Tropicais – Fundação André Tosello foram alvo de determinação da

atividade antifúngica dos méis em estudo.

Para os fungos filamentosos, após a esterilização do meio de cultivo (ágar Saboroud (AS), cuja composição contém 10 g de peptona, 40 g de glicose e 15 g de ágar bacteriológico para 1 L de água), este foi vertido em placas de Petri previamente esterilizadas (cerca de 20 mL de meio por placa). Após a solidificação, depositou-se 500 µL da solução de mel filtrada em membrana Sartorius (0,22 µm) e espalhou-se a mesma sobre a superfície com uma alça de Drigalski estéril. Um disco de micélio (cerca de 8 mm de diâmetro), retirado das bordas da colônia do fungo (em AS, 7 dias de incubação) foi disposto no centro. Para efeito comparativo, placas do mesmo meio, porém sem a adição da solução de mel, foram também inoculadas.

Determinou-se o diâmetro médio das colônias (em milímetros) 24, 48 e 168 h após a incubação ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), e por comparação com o crescimento micelial das colônias nas placas testemunhas, calculou-se a percentagem de inibição do crescimento micelial, que consistiu na seguinte fórmula: $I = 100 * (T - B / T)$, onde: I – percentagem de inibição; B – diâmetro médio das colônias do fungo na presença da solução de mel e T – diâmetro médio das colônias testemunhas.

4.8 – Delineamento Estatístico

Antes de proceder-se a avaliação dos dados, testou-se a normalidade dos mesmos pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*, premissa para escolha do teste estatístico a ser aplicado. Foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal Wallis* a 95 % de significância, ($p < 0,05$), pois os dados não apresentaram distribuição normal.

Realizou-se, ainda, a correlação de *Spearman* a 95 % de significância, $p < 0,05$ e 99% de significância, $p < 0,01$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Características Climáticas das Regiões de Coleta

Conforme observa-se na Figura 23, a precipitação média observada de Janeiro a Dezembro de 2008, na maior parte das mesorregiões de Alagoas, ficou acima da média acumulada, excetuando-se a mesorregião do Agreste. Nessa região, a precipitação observada ficou em torno de 1200 mm, enquanto no Baixo São Francisco foi de cerca de 1750 mm, na Zona da Mata foi de cerca de 1550 mm, no litoral foi de 2025 mm, e no sertão foi de aproximadamente 900 mm no período. O maior desvio positivo da precipitação acumulada foi apresentado pelo Baixo São Francisco (36,2 %), e o único desvio negativo ocorreu na mesorregião do Agreste (-0,2 %). As demais mesorregiões atingiram os seguintes desvios entre as médias observadas e acumuladas: Sertão: 21,5 %; Sertão do São Francisco: 7,3 %; Zona da Mata: 16,7 %; e Litoral: 24,0 % (SRHMA-AL, 2009).

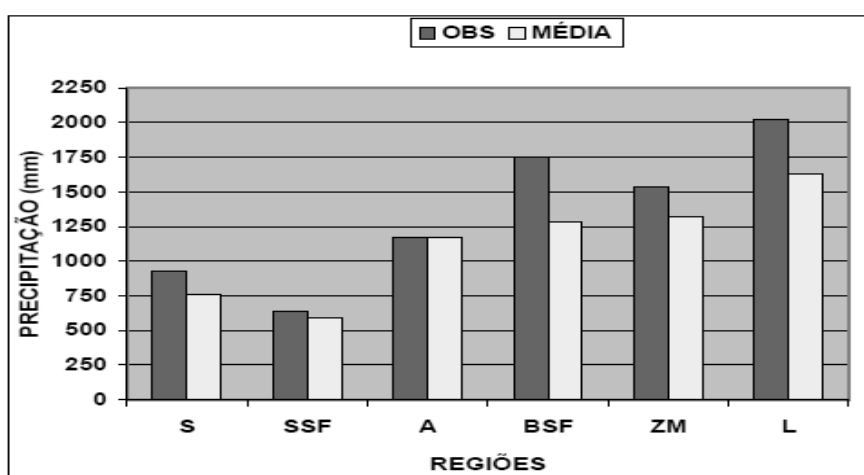


FIGURA 23 – Precipitação climatológica média observada e histórica acumulada, nas mesorregiões do Estado de Alagoas, nos meses de Janeiro a Dezembro de 2008. S: Sertão; SSF: Sertão do São Francisco; A: Agreste; BSF: Baixo São Francisco; ZM: Zona da Mata; e L: Litoral. Fonte: SRHMA – AL, 2009.

A precipitação média acumulada de Janeiro a Fevereiro de 2009 manteve-se em torno da média histórica nas regiões do Agreste e Baixo São Francisco (-15% a +15%), mas acima desta na Zona da Mata e Litoral e abaixo da mesma no Sertão e Sertão do São Francisco (SRHMA-AL, 2009).

A Tabela 2, por outro lado, apresenta dados de altitude, temperatura e índice

pluviométrico dos municípios onde as estações de coleta das amostras de mel foram implantadas.

TABELA 2 – Municípios de coleta das amostras de mel (com códigos) de abelhas nativas e africanizadas, temperatura e índice pluviométrico dos mesmos na estação seca de 2008/09.

Municípios de Coleta de Mel	Amostras*	Altitude (m) **	Temperatura Média (°C) **	Índice Pluviométrico (mm) **
Barra de Santo Antônio (Litoral Norte)	AU1, AU2, AU3, AU11, AU12	10	29	2404,5
Barra de São Miguel (Litoral Sul)	M13	2	29	2050
Colônia Leopoldina (região canavieira)	AU8, AU9, AU10	140	22	1393,1
Delmiro Gouveia (Sertão: R.S. Francisco)	AM1, AM2, AM3, AJ1, AJ2, AP1, AP2	256	31	481,3
Ibateguara (Região Canavieira)	AU5, AU6, AU7	505	22	1600
Mar Vermelho (Mata Atlântica)	M9, M10,	636	26	1550
Marechal Deodoro (Litoral Sul)	AU13	5	26	1872,4
Palmeira dos Índios (Agreste)	AU4, AU14, AU15, AU16, AU17, AU18, AU19, AU20, AU21, AU22	290	30	1102,7
Viçosa (Mata Atlântica)	M3, M8, M11, M14	210	29	1500

* Amostras: M3, M8-11, M13-14: Mel de *Apis mellifera*; M1-2, M4-7 e M12: Mel comercial de *A. mellifera*; AU – Mel de Urucú (*M. scutellaris*), AM – Mel de Mandaia (*M. quadrifasciata*), AJ – Mel de Jandaíra (*M. subnitida*), AP – Mel de Plebéia (*Plebeia* sp.). ** Dados da SRHMA -AL, 2009.

5.2 – Parâmetros Físico-químicos dos méis

A Tabela 3 apresenta um sumário das médias obtidas em todos os parâmetros físico-químicos analisados nas 43 amostras de méis (14 de *A. mellifera*, 22 de *M. scutellaris*, 03 de *M. quadrifasciata*, 02 de *M. subnitida* e 02 de *Plebeia* sp.). Já na Tabela 4, um resumo da análise de Normalidade (*Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*) dessas médias é apresentado. Apenas as médias de condutividade elétrica, glicídios redutores e sacarose apresentaram distribuição normal, optando-se então, por testes não paramétrico para todos os parâmetros.

TABELA 3 – Determinação de umidade (%), pH, acidez livre (meq. Kg⁻¹), condutividade elétrica (mS. cm⁻¹), proteínas totais (mg . 100g⁻¹), prolina (mg . 100g⁻¹), glicídios redutores, glicídios totais e sacarose (%), diastase (G), HMF (mg . Kg⁻¹) e cor (mm Pfund) em amostras de mel de abelhas nativas e africanizadas de Alagoas, estação seca de 2008/09.

Mel	U%	pH	Acidez	C.E.	Prot.	Prol.	GR	GT	Sac.	Diast.	HMF	Cor
M1	20,0	3,43	27,72	0,59	7,26	149,12	66,49	72,67	5,87	26,18	80,2	48,20
M2	20,2	3,81	39,27	0,49	5,95	55,66	75,3	78,12	2,68	26,25	75,9	44,12
M3	19,0	5,40	18,48	1,15	9,50	48,44	68,68	71,02	2,22	26,55	78,1	38,55
M4	19,3	3,93	43,89	0,50	8,96	123,83	73,52	78,12	4,37	51,45	128,2	64,17
M5	19,0	4,13	25,41	0,31	7,07	56,56	57,87	65,79	7,52	16,82	44,2	26,66
M6	20,0	3,64	38,40	0,27	7,18	93,13	77,16	80,2	2,89	36,45	81,1	102,42
M7	17,5	3,51	14,40	0,28	6,25	71,01	71,02	75,4	4,16	4,50	42,7	23,32
M8	18,5	6,54	7,20	0,84	6,75	71,91	76,21	82,23	5,72	12,45	34,4	45,60
M9	19,0	5,52	31,20	0,86	6,68	40,31	71,02	78,12	6,75	20,20	30,3	40,77
M10	19,5	4,81	26,40	0,69	8,34	57,01	71,03	72,67	1,56	16,84	22,1	52,66
M11	20,0	4,24	24,00	0,50	10,43	58,37	75,30	77,16	1,77	40,50	10,5	54,89
M12	21,0	3,82	52,81	0,42	6,49	103,52	68,68	72,67	3,79	29,71	10,0	94,62
M13	24,0	4,11	36,00	0,68	6,02	52,05	71,02	73,59	2,44	22,80	4,5	107,99
M14	20,0	5,14	16,80	0,79	5,02	56,56	69,44	73,52	3,88	17,53	1,5	44,49
AU1	38,6	6,85	6,85	0,30	11,77	10,52	62,50	63,13	0,60	2,70	2,9	27,40
AU2	28,8	6,90	6,90	0,66	13,03	10,52	59,52	62,50	2,83	3,61	2,7	67,14
AU3	37,2	6,80	6,80	0,78	3,81	9,16	57,87	59,52	1,57	3,50	1,9	44,86
AU4	27,7	3,83	30,03	0,31	4,82	13,22	67,93	69,44	1,43	4,92	1,1	76,43
AU5	29,0	4,25	13,86	0,28	6,52	22,25	72,67	75,3	2,50	3,71	14,7	68,26
AU6	28,0	4,19	16,17	0,26	9,11	16,38	67,20	70,22	2,97	3,97	13,2	76,31
AU7	37,0	4,32	13,86	0,23	5,06	10,51	65,79	72,67	6,54	3,51	19,8	167,79
AU8	29,5	5,80	6,93	0,48	4,05	8,71	63,77	69,44	5,39	3,15	15,6	39,66
AU9	30,0	4,96	6,93	0,28	4,20	10,97	65,89	73,5	7,23	3,23	25,7	32,23
AU10	28,0	3,86	110,88	0,62	7,65	10,06	75,3	75,3	0,00	2,77	23,7	121,74
AU11	26,0	5,45	7,20	0,59	4,98	31,73	73,52	75,3	1,69	3,65	16,5	89,05
AU12	28,0	5,97	4,80	0,60	5,02	31,28	69,75	74,4	4,42	2,39	18,9	58,23
AU13	29,5	6,61	4,80	0,52	6,60	10,67	62,5	65,1	2,47	7,94	17,8	165,56
AU14	29,0	3,91	28,80	0,51	4,28	31,28	69,44	73,52	3,88	8,06	80,1	138,45
AU15	28,0	4,56	19,20	0,60	4,12	27,22	67,2	73,52	6	9,16	0,4	149,22
AU16	29,0	3,87	69,60	0,66	4,78	36,25	70,22	72,67	2,33	8,43	13,3	196,38
AU17	28,5	4,11	28,80	0,55	5,48	22,25	65,79	71,02	4,97	6,13	0,0	168,16
AU18	30,0	4,18	36,00	0,56	5,59	31,73	65,79	69,44	3,47	5,32	0,3	196,38
AU19	25,0	6,90	2,40	1,15	4,70	22,70	69,44	71,02	1,5	18,60	7,8	99,46
AU20	26,0	6,90	2,40	1,16	4,01	21,80	65,78	69,44	3,48	14,90	6,4	98,71
AU21	29,0	4,47	28,80	0,67	5,71	31,28	63,77	67,93	3,95	4,80	6,9	118,02
AU22	27,5	4,37	26,40	0,47	4,28	23,16	66,49	71,83	5,07	4,74	0,9	106,14
AM1	29,5	3,76	36,96	0,57	5,17	8,70	72,67	73,53	0,82	2,07	10,1	45,60
AM2	29,0	3,73	40,80	0,77	6,06	40,31	67,20	71,83	4,4	28,30	12,3	263,98
AM3	27,0	3,39	55,21	0,57	5,44	41,21	70,22	73,52	3,14	8,90	0,0	84,97
AJ1	32,0	3,75	43,89	0,60	4,98	19,99	73,52	75,3	1,69	4,68	8,8	39,66
AJ2	29,0	3,38	60,00	0,55	5,60	34,60	74,4	75,3	0,85	8,36	0	51,17
P1	34,5	4,13	90,09	0,78	19,19	34,44	70,22	71,84	1,54	16,71	19,5	198,98
P2	29,0	3,71	170,40	0,90	6,49	154,08	69,44	70,22	0,72	19,20	22,5	249,13

M3, M8-11, M13-14: Mel de *Apis mellifera*; M1-2, M4-7 e M12: Mel comercial de *A. mellifera*; AU – Mel de Uruçú (*M. scutellaris*), AM – Mel de Mandaçaia (*M. quadrifasciata*), AJ – Mel de Jandaíra (*M. subnitida*), AP – Mel de Plebéia (*Plebeia* sp.).

TABELA 4 – Teste de Normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*, para as médias dos parâmetros físico-químicos avaliados em amostras de méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas na estação seca de 2008/09.

Parâmetros Físico- Químicos	<i>Kolmogorov-Smirnov</i>			<i>Shapiro-Wilk</i>		
	n	Índice de significância	n	Índice de Significância		
Umidade (%)	0,160	43	0,008	0,912	43	0,003
pH	0,210	43	0,000	0,843	43	0,000
Acidez meq. Kg ⁻¹	0,191	43	0,000	0,754	43	0,000
Cond. Elétrica mS. Cm ⁻¹	0,110	43	0,200(*)	0,934	43	0,016
Proteína mg. 100g ⁻¹	0,202	43	0,000	0,757	43	0,000
Prolina mg. 100g ⁻¹	0,185	43	0,001	0,805	43	0,000
Glicídios Redutores (%)	0,097	43	0,200(*)	0,969	43	0,295
Glicídios Totais (%)	0,124	43	0,095	0,956	43	0,102
Sacarose (%)	0,092	43	0,200(*)	0,965	43	0,207
Diastase (G)	0,214	43	0,000	0,833	43	0,000
HMF mg. Kg ⁻¹	0,240	43	0,000	0,745	43	0,000
Cor mm Pfund	0,148	43	0,019	0,876	43	0,000
Fenóis mg. 100 g ⁻¹	0,215	43	0,000	0,872	43	0,000
Flavonóides mg . 100 g ⁻¹	0,146	43	0,021	0,926	43	0,008
FRAP eq.mg ác. gálico. 100 g ⁻¹	0,231	43	0,000	0,883	43	0,000
DPPH eq.mg ác. gálico. 100 g ⁻¹	0,176	43	0,002	0,955	43	0,092
DPPH eq.mg quercetina.100 g ⁻¹	0,191	43	0,000	0,938	43	0,022

* apenas as médias de condutividade elétrica, concentração de glicídios redutores e de sacarose apresentaram distribuição normal.

A Tabela 5 apresenta os índices de significância para diferenças entre médias de um mesmo parâmetro entre méis de distintas abelhas, sendo a escala crescente de diferença entre as médias estabelecida através de um *ranking* de 1-5 na Tabela 6. A Tabela 7, por outro lado, apresenta a correlação de *Spearman* para as médias dos parâmetros físico-químicos avaliados entre as amostras dos méis de diferentes origens entomológicas.

TABELA 5 – Teste de *Kruskal Wallis* para verificar se há diferença significativa entre as amostras de mel de abelhas nativas e africanizadas analisadas dentro de cada parâmetro (estação seca de 2008/09).

ESTATÍSTICA PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	Qui-quadrado	Índice de significância
Um (%)	28,847	0,000*
pH	15,886	0,003*
Acidez meq. Kg ⁻¹	16,582	0,002*
Cond. Elétrica mS. cm ⁻¹	4,068	0,397
Proteína mg. 100g ⁻¹	12,635	0,013*
Prolina mg. 100g ⁻¹	28,895	0,000*
GR (%)	12,464	0,014*
GT (%)	12,746	0,013*
Sacarose (%)	7,483	0,112
Diastase (G)	22,491	0,000*
HMF mg. Kg ⁻¹	13,277	0,010*
Cor mm Pfund	13,927	0,008*
Fenóis mg. 100 g	24,093	0,000*
Flavonóides mg. 100 g	17,531	0,002*
FRAP eq.mg ác. gálico. 100 g ⁻¹	20,705	0,000*
DPPH eq.mg ác. gálico. 100 g ⁻¹	25,274	0,000*
DPPH eq.mg quercetina.100 g ⁻¹	25,236	0,000*

*95 % de probabilidade, $p < 0,05$.

TABELA 6 – *Ranking* (1-5) comparativo das médias estatisticamente diferentes entre si para cada parâmetro físico-químico entre os méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas (coletados durante a estação de seca 2008/09), segundo teste não paramétrico de *Kruskal Wallis*. Méis com números iguais a 1 não foram diferentes entre si, e a partir desse, as médias foram diferentes em ordem crescente.

MÉIS DE ABELHAS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Melipona quadrifasciata</i>	<i>Melipona subnitida</i>	<i>Plebeia</i> sp.
Umidade (%)	1	3	2	4	5
pH	4	5	3	1	2
Acidez meq. Kg ⁻¹	2	1	3	4	5
Cond. Elétrica mS. cm ⁻¹	1	1	1	1	1
Proteína mg. 100g ⁻¹	4	2	3	1	5
Prolina mg. 100g ⁻¹	5	1	3	2	4
GR (%)	4	1	3	5	2
GT (%)	4	2	3	5	1
Sac (%)	1	1	1	1	1
Diastase (G)	5	1	3	2	4
HMF mg. Kg ⁻¹	5	3	2	1	4
Cor mm Pfund	2	3	4	1	5
Fenóis Totais mg. 100 g	4	3	2	1	5
Flavonóides Totais mg. 100 g	4	3	2	1	5
FRAP eq.mg ác. gálico. 100 g ⁻¹	5	2	3	1	4
DPPH eq.mg ác. gálico. 100 g ⁻¹	5	1	4	2	3
DPPH eq.mg quercetina.100 g ⁻¹	5	1	4	2	3

TABELA 7 – Coeficiente de correlação de *Spearman* entre os parâmetros físico-químicos de méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas, durante a estação de seca 2008/09.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	Umidade (%)	pH	Acidez meq. Kg ⁻¹	Con. Elet. mS. Cm ⁻¹	Proteína mg. 100g ⁻¹	Prolina mg. 100 g ⁻¹	Glicídios Redutores (%)	Glicídios Totais (%)	Sacarose (%)
Umidade (%)	1,000	0,072	-0,014	-0,126	-0,303(*)	-0,697(**)	-0,392(**)	-0,434(**)	-0,250
pH	0,072	1,000	-0,808(**)	0,288	-0,111	-0,409(**)	-0,421(**)	-0,372(*)	0,108
Acidez meq. Kg ⁻¹	-0,014	-0,808(**)	1,000	0,041	0,205	0,396(**)	0,455(**)	0,319 (*)	-0,231
Con. Elétrica mS. cm ⁻¹	-0,126	0,288	0,041	1,000	-0,048	0,146	0,050	-0,092	-0,210
Proteína mg. 100g ⁻¹	-0,303(*)	-0,111	0,205	-0,048	1,000	0,378(*)	0,212	0,099	-0,185
Prolina mg. 100g ⁻¹	-0,697(**)	-0,409(**)	0,396(**)	0,146	0,378(*)	1,000	0,429(**)	0,428(**)	0,165
Glicídios Redutores (%)	-0,392(**)	-0,421(**)	0,455(**)	0,050	0,212	0,429(**)	1,000	0,896(**)	-0,309(*)
Glicídios Totais (%)	-0,434(**)	-0,372(*)	0,319(*)	-0,092	0,099	0,428(**)	0,896(**)	1,000	0,078
Sacarose (%)	-0,250	0,108	-0,231	-0,210	-0,185	0,165	-0,309(*)	0,078	1,000
Diastase G	-0,605(**)	-0,274	0,378(*)	0,272	0,325(*)	0,803(**)	0,292	0,251	0,091
HMF mg. Kg ⁻¹	-0,369(*)	-0,119	0,047	-0,104	0,376(*)	0,387(*)	0,312(*)	0,377(*)	0,205
Cor mm Pfund	0,309(*)	-0,156	0,331(*)	0,161	-0,096	-0,026	-0,075	-0,176	-0,096
Fenóis mg. 100g ⁻¹	-0,569(**)	-0,070	0,137	0,257	0,498(**)	0,711(**)	0,249	0,187	0,058
Flavonóides mg. 100g ⁻¹	-0,453(**)	-0,140	0,239	0,233	0,388(*)	0,629(**)	0,248	0,141	-0,034
FRAP mg ác. gálico.100 g ⁻¹	-0,680(**)	-0,208	0,239	0,312(*)	0,427(**)	0,750(**)	0,369(*)	0,264	-0,061
DPPH mg ác. gálico.100g ⁻¹	-0,570(**)	-0,523(**)	0,466(**)	0,019	0,270	0,754(**)	0,502(**)	0,534(**)	0,152
DPPH mg quercetina.100g ⁻¹	-0,541(**)	-0,512(**)	0,457(**)	0,013	0,306(*)	0,745(**)	0,491(**)	0,518(**)	0,112

* 95 % de significância, p<0,05; **99% de significância, p<0,01.

TABELA 7 – Continuação... Coeficiente de correlação de *Spearman* entre os parâmetros físico-químicos de méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas, durante a estação de seca 2008/09.]

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	Diastase G	HMF mg. Kg ⁻¹	Cor mm Pfund	Fenóis mg. 100g ⁻¹	Flavonóides mg. 100 g ⁻¹	FRAP Eq. mg de AG. 100g-1	DPPH Eq. mg de AG. 100g ⁻¹	DPPH Eq. mg de Q. 100 g ⁻¹
Umidade (%)	-0,605(**)	-0,369(*)	0,309(*)	-0,569(**)	-0,453(**)	-0,680(**)	-0,570(**)	-0,541(**)
pH	-0,274	-0,119	-0,156	-0,070	-0,140	-0,208	-0,523(**)	-0,512(**)
Acidez meq. Kg ⁻¹	0,378(*)	0,047	0,331(*)	0,137	0,239	0,239	0,466(**)	0,457(**)
Con. Elétrica mS. cm ⁻¹	0,272	-0,104	0,161	0,257	0,233	0,312(*)	0,019	0,013
Proteína mg. 100g ⁻¹	0,325(*)	0,376(*)	-0,096	0,498(**)	0,388(*)	0,427(**)	0,270	0,306(*)
Prolina mg. 100g ⁻¹	0,803(**)	0,387(*)	-0,026	0,711(**)	0,629(**)	0,750(**)	0,754(**)	0,745(**)
Glicídios Redutores (%)	0,292	0,312(*)	-0,075	0,249	0,248	0,369(*)	0,502(**)	0,491(**)
Glicídios Totais (%)	0,251	0,377(*)	-0,176	0,187	0,141	0,264	0,534(**)	0,518(**)
Sacarose (%)	0,091	0,205	-0,096	0,058	-0,034	-0,061	0,152	0,112
Diastase G	1,000	0,262	0,136	0,784(**)	0,694(**)	0,811(**)	0,644(**)	0,626(**)
HMF mg. Kg ⁻¹	0,262	1,000	-0,226	0,512(**)	0,407(**)	0,400(**)	0,414(**)	0,405(**)
Cor mm Pfund	0,136	-0,226	1,000	0,106	0,205	0,027	-0,106	-0,139
Fenóis mg. 100g ⁻¹	0,784(**)	0,512(**)	0,106	1,000	0,803(**)	0,814(**)	0,541(**)	0,537(**)
Flavonóides mg. 100g ⁻¹	0,694(**)	0,407(**)	0,205	0,803(**)	1,000	0,795(**)	0,537(**)	0,534(**)
FRAP mg ác. gálico.100 g ⁻¹	0,811(**)	0,400(**)	0,027	0,814(**)	0,795(**)	1,000	0,584(**)	0,568(**)
DPPH mg ác. gálico.100g ⁻¹	0,644(**)	0,414(**)	-0,106	0,541(**)	0,537(**)	0,584(**)	1,000	0,992(**)
DPPH mg quercetina.100g ⁻¹	0,626(**)	0,405(**)	-0,139	0,537(**)	0,534(**)	0,568(**)	0,992(**)	1,000

* 95 % de significância, p<0,05; **99% de significância, p<0,01.

Enquanto os méis de *A. mellifera* são produzidos e distribuídos principalmente no continente Europeu e Asiático, o mel de abelhas sem ferrão é um alimento conhecido e utilizado na América do Sul, África e Austrália, e tem distribuição limitada a nível mundial, principalmente devido à reduzida produção pelas diferentes espécies de meliponíneos, menor vida útil, face ao teor de umidade desses méis e, ainda, à ausência de uma norma de qualidade institucional, em função da carência de estudos envolvendo tais produtos (GUERRINI *et al.*, 2009).

5.2.1 Determinação de Umidade

No tocante ao conteúdo de umidade nos diferentes méis avaliados, constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as amostras (Tabela 6), sendo este menor em mel de *A. mellifera* (17,5 - 24,0 %, média $19,79 \pm 1,48$ %), em relação às amostras de mel de abelhas nativas, descrito em ordem crescente: *Melipona quadrifasciata* ($28,50 \pm 1,32$ %) < *M. scutellaris* ($29,51 \pm 3,53$ %) < *M. subnitida* ($30,50 \pm 2,12$ %) < *Plebeia* sp. ($31,75 \pm 3,88$ %).

Com relação às amostras de mel de *A. mellifera*, portanto, apenas 3 amostras apresentaram valores excedentes a 20 % de umidade, que é o limite estabelecido pela legislação Brasil (2000). O índice de umidade dos méis de abelhas nativas, portanto, não atendeu essa legislação vigente, embora esta seja exclusiva para méis de abelhas africanizadas. Entretanto, todas as amostras de nativas apresentaram conteúdo de umidade próximo ao de outras espécies do gênero *Melipona* (ALVES *et al.*, 2005; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007; SOUZA, 2008; SOUZA *et al.*, 2009).

Estudos sobre as características físico-químicas de méis de *M. scutellaris* provenientes dos Estados da Bahia e da Paraíba, por exemplo, demonstraram que estes apresentaram 28,40% de umidade, valores próximos aos do presente estudo (MARCHINI *et al.*, 1998). Esse parâmetro está diretamente relacionado ao sabor do produto, muito apreciado por ser menos doce e enjoativo em comparação ao mel de *A. mellifera* (VILLAS-BÔAS & MALASPINA, 2005).

5.2.2 – Determinação de pH e acidez livre

Com relação ao pH e à acidez livre dos méis das diferentes espécies avaliadas, verificou-se diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$ (Tabela 6). O pH dos méis de *A. mellifera* variou de 3,43-6,54 (média $4,43 \pm 0,91$), enquanto que o de mel de *M.*

scutellaris variou entre 3,83 e 6,90 (média de $5,14 \pm 1,20$). Em relação aos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp. a média foi de $3,62 \pm 0,20$, $3,56 \pm 0,26$ e $3,92 \pm 0,29$, respectivamente.

No tocante à acidez livre, a média foi de $28,71 \pm 12,49$ meq. Kg⁻¹ nos méis de *Apis*, estando apenas uma amostra fora das recomendações estabelecidas pela legislação (BRASIL, 2000), que é de no máximo 50 meq . Kg⁻¹. Entretanto, nos méis de meliponíneos observou-se ampla variação desta ($2,4 - 170,4$ meq. Kg⁻¹), sendo a maior acidez para o mel de *Plebeia* sp, Tabela 3. Foi observada uma correlação inversa estatisticamente significativa ($-0,808$), $p < 0,05$, entre acidez livre e pH, Tabela 7.

A acidez do mel das abelhas nativas em geral é maior em relação ao mel de *A. mellifera*, fato detectável pelo sabor, sendo este um dos parâmetros que define a preferência do consumidor pelo mel das abelhas nativas (VIT *et al.*, 2004). O valor proposto por Villas-Bôas & Malaspina (2005) estabelece o máximo de 85 meq. Kg⁻¹ para o mel de meliponíneos.

O pH e a acidez do mel podem estar diretamente relacionados à composição florística nas áreas de coleta, uma vez que podem ser influenciados pela variação de ácidos orgânicos e pH do néctar, o qual é submetido à ação da glicose-oxidase formando ácido glucônico, mas também à ação de enzimas bacterianas durante a sua maturação, e, ainda, pela quantidade de minerais presentes, e diferenças na composição do solo ou associação de espécies vegetais para a composição final (CRANE, 1983; MOREIRA & DE MARIA, 2001; BOGDANOV, 2002; EVANGELISTA-RODRIGUES *et al.*, 2005). Evangelista-Rodrigues *et al.* (2005), por exemplo, observaram que houve diferença significativa de pH entre os méis de *M. scutellaris* e *A. mellifera*, mesmo quando produzidos em uma mesma localidade, Estado da Paraíba, fator que pode ser explicado pela presença de substâncias mandibulares acrescidas ao néctar durante o transporte do mesmo até a colméia. Souza (2008), também avaliando a qualidade físico-química de méis de abelhas nativas do Estado da Bahia, observou uma variação de pH entre 3,12 a 6,5, enquanto que o teor de acidez variou entre 5,1 a 116,8 meq. Kg⁻¹.

5.2.3 – Determinação de Condutividade elétrica

Em relação à condutividade elétrica, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os méis das diferentes abelhas estudadas no Estado de Alagoas na estação seca de 2008/09, (Tabela 6). A condutividade elétrica variou de 0,27-1,15 mS.cm⁻¹ para os méis de abelhas africanizadas, e de 0,23-1,16 mS.cm⁻¹ para os méis

de *M. scutellaris*. No entanto, nos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp, a condutividade foi respectivamente de $0,63 \pm 0,11 \text{ mS.cm}^{-1}$, $0,57 \pm 0,03 \text{ mS.cm}^{-1}$ e $0,84 \pm 0,08 \text{ mS.cm}^{-1}$.

Os conteúdos de ácidos orgânicos, sais minerais e proteínas influenciam na condutividade elétrica do mel (ACQUARONE *et al.*, 2007; BOGDANOV, 2002; CRANE, 1983). De acordo com Souza *et al.* (2004), a condutividade elétrica de méis de *M. asilvai* produzidos na Bahia variou de 287,5 a 525 $\mu\text{S.cm}^{-1}$. Por outro lado, Souza *et al.* (2009), avaliando mel de diferentes espécies de *Melipona* observaram variação de 255,0 e 905,7 $\mu\text{S cm}^{-1}$ para os diferentes méis.

5.2.4 – Determinação de Glicídios Redutores, Glicídios Totais e Sacarose

Houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes méis avaliados em relação ao conteúdo GR e GT, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quanto ao conteúdo de sacarose aparente (Tabela 6).

O percentual de GR em mel de *A. mellifera* foi de $70,91 \pm 4,91 \%$, enquanto que o de GT foi de $75,09 \pm 4,24 \%$. Já em relação a mel de *M. scutellaris*, o conteúdo de GR variou entre 57,87 e 75,30 % (média de $66,73 \pm 4,25 \%$), enquanto que o de GT variou de 59,52 a 75,30 % (média de $70,28 \pm 4,37 \%$). Em estudos de méis de *A. mellifera* de diferentes floradas no Estado do Piauí, Silva *et al.* (2004) já haviam detectado um percentual médio de GR de 77,25 %, com variação entre 68,92 e 85,49 %, enfatizando a influência da origem floral na composição química desse mel.

Em relação aos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp, o conteúdo de GR variou respectivamente entre 67,20 e 72,67%, 73,52 e 74,40% e 69,44 e 70,22 %. No que, se refere ao conteúdo médio de GT, este foi respectivamente de $72,96 \pm 0,97 \%$, $75,30 \pm 0,0 \%$ e $71,03 \pm 1,14 \%$. Em São Gabriel, município da região semi-árida do Estado da Bahia, Alves *et al.* (2005) detectaram que o conteúdo de GR em mel de *M. mandaçaia* variou entre 64,29% e 82,10%, média de $74,82 \pm 4,28 \%$, semelhante aos valores encontrados para os méis de abelhas nativas estudados na presente dissertação.

O percentual de sacarose variou entre 1,56 e 7,52% (média de $3,97 \pm 1,88 \%$) para méis de *A. mellifera*, sendo que duas amostras apresentaram valores superiores ao limite de 6% preconizado pela legislação (BRASIL, 2000). Os méis de *M. scutellaris* apresentaram média de $3,37 \pm 1,93 \%$ de sacarose, enquanto que os de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp apresentaram respectivamente $2,78 \pm 1,81 \%$, $1,27 \pm 0,59 \%$ e $1,13 \pm 0,58 \%$ de sacarose, todos com teores abaixo do limite estabelecido pela legislação para méis de

abelhas africanizadas, já que não há padrões para méis de nativas. Foi observada uma correlação positiva entre glicídios redutores e glicídios totais de 0,896 e negativa entre glicídios totais e sacarose aparente (-0,309), Tabela 7.

Almeida-Anacleto (2007) avaliando méis de meliponíneos produzidos no município de Piracicaba-SP observou que o conteúdo de sacarose variou entre 0,13 e 2,32%, média de 0,94%, valores inferiores aos encontrados no presente estudo. Por outro lado, Souza *et al.* (2009) observaram uma variação entre 0,2 e 9,0 % para méis de diferentes meliponíneos, no entanto, para o mel de *M. scutellaris* a variação foi de 0,2 a 6,2%. Altas concentrações deste dissacarídeo em mel é indicativo de colheita prematura deste, antes de uma maior ação da invertase sobre a sacarose (CRANE, 1983).

5.2.5 – Determinação de Proteínas Totais

Embora não exista um padrão pré-estabelecido na legislação brasileira para esse parâmetro, que oscila em função da origem floral, a concentração de proteínas em mel de abelhas africanizadas geralmente é baixa e, provavelmente, restrita às oxidases e hidrolases. Para os méis de nativas existem poucos estudos a respeito, dificultando assim a comparação com relação a esse parâmetro entre méis de diferentes origens entomológicas.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os méis das diferentes espécies avaliadas em relação ao conteúdo de proteínas totais (Tabela 6), sendo a menor concentração detectada em mel de *M. subnitida*, seguida por: *M. scutellaris* < *M. quadrifasciata* < *A. mellifera* < *Plebeia* sp (Tabela 6). Em mel de *A. mellifera*, esse parâmetro variou de 5,02-10,43 eq. mg de albumina. 100 g⁻¹ (média de 7,27 ± 1,51 eq. mg de albumina. 100 g⁻¹). No entanto, em méis de meliponíneos variou de 3,81-19,19 eq. mg de albumina. 100 g⁻¹, sendo este conteúdo maior no mel de *Plebeia* sp, Tabela 3.

Dois métodos de extração de proteínas foram comparados visando obter-se o melhor perfil cromatográfico das mesmas em camada delgada (CCD), e a mais eficiente quantificação, sendo o primeiro com acetona a -20°C (PERALTA, 2003) e o segundo com HCl-clorofórmio-metanol (OLIVEIRA, 2006). O método mais eficiente para ambos foi aquele que partiu da suave precipitação ácida, revelando que o perfil de bandas protéicas (Figuras 24 e 25) entre os méis de abelhas africanizadas e nativas foi semelhante (fatores de retenção (Rfs) variaram entre 0,53 e 0,58).

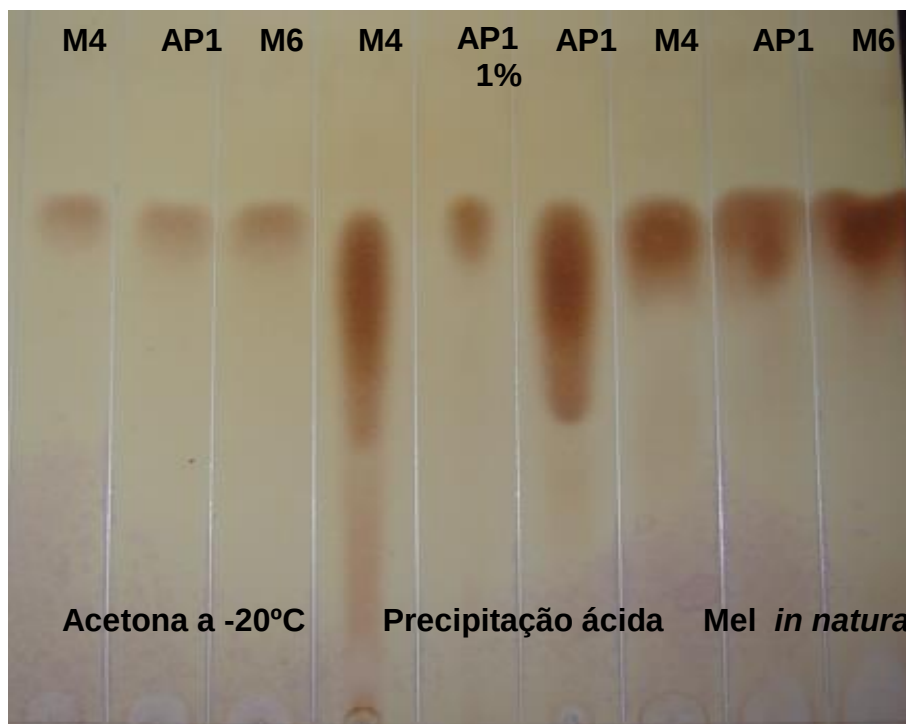


FIGURA 24 – Perfil cromatográfico em camada delgada (sílica gel 60) de proteínas totais de mel de *A. mellifera* e de abelhas nativas do Estado de Alagoas (estação seca de 2008/09), *in natura* ou extraídas (por acetona a -20°C ou por suave precipitação com HCl: clorofórmio: metanol), e reveladas por ninhidrina e aquecimento a 105° por 5 min. M4-6: *A. mellifera*; AP: *Plebeia* sp.

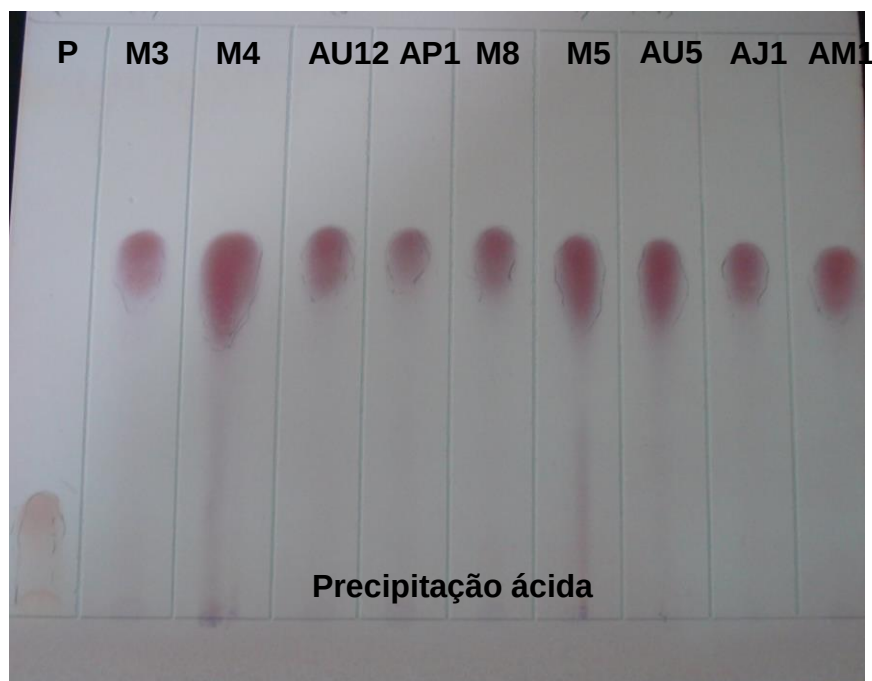


FIGURA 25 – Perfil cromatográfico em camada delgada (sílica gel 60) de proteínas totais de mel de *A. mellifera* e de abelhas nativas do Estado de Alagoas (estação seca de 2008/09), obtidas por suave precipitação com HCl-clorofórmio-metanol, e reveladas por ninhidrina e aquecimento a 105° por 5 min. P= padrão de prolina; M3-8: *A. mellifera*; AU5-12: *M. scutellaris*; AJ1: *M. subnitida* AP1: *Plebeia* sp; AM1: *M. quadrifasciata*.

Segundo Arruda *et al.* (2004), o conteúdo de proteínas totais em mel de abelhas africanizadas variou de 0,0036-2,79 %. Em estudos de Alves (2008), envolvendo mel orgânico de *A. mellifera* produzido uma APA no Estado do Paraná, o conteúdo de proteínas totais variou de 0,37-0,63 %, com valor médio de $0,50 \pm 0,07$ %. Por outro lado, quando Souza (2008) estudou esse parâmetro em méis de nativas do Estado da Bahia, observou uma variação de 0,04 a 2,37 %, enquanto que Almeida-Anacleto (2007) observou uma variação entre 0,15 a 0,57 % para méis de nativas no município de Piracicaba, em São Paulo, ocorrendo o menor conteúdo no mel de *Scaptotrigona bipunctata*, e o maior no mel de *Tetragonisca angustula*. Entretanto, o método utilizado para tais quantificações percentuais é o Kjeldahl, que se fundamenta na correlação entre nitrogênio total e conteúdo total de proteínas, podendo assim super-estimar os resultados, considerando-se que há no mel aminoácidos livres que também responderão às reações. No método de Lowry, entretanto, as reações envolvem as ligações peptídicas (LOWRY *et al.*, 1951; ZAIA *et al.*, 1998).

O mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas (LOWRY *et al.*, 1951; ZAIA *et al.*, 1998).

5.2.6 – Determinação de Prolina

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os méis de diferentes origens entomológicas, sendo estes classificados na seguinte ordem crescente de concentração de prolina: *M. scutellaris* < *M. subnitida* < *M. quadrifasciata* < *A. mellifera* < *Plebeia* sp (Tabela 6). O mel de *A. mellifera* apresentou variação entre 40,31-149,12 eq. mg de prolina. 100 g^{-1} (média de $74,10 \pm 31,77$ eq. mg de prolina. 100 g^{-1}), enquanto os méis de *M. scutellaris* apresentaram variação de 8,71-36,25 eq. mg de prolina. 100 g^{-1} (média de $20,16 \pm 9,37$ eq. mg. 100 g^{-1}), e os méis de *M. subnitida*, *M. quadrifasciata* e *Plebeia* sp apresentaram respectivamente médias de $27,29 \pm 10,33$, $30,07 \pm 18,51$ e $94,26 \pm 84,59$ eq. mg de prolina. 100 g^{-1} . Exceto o mel de *Plebeia* sp, portanto, todos os demais méis de nativas apresentaram conteúdo de prolina inferior ao das abelhas africanizadas. Verificou-se correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o teor de prolina e o de proteínas totais (0,325) além da correlação significativa entre o conteúdo de α -amilase (diastase) e conteúdo de prolina (0,803) (Tabela 7).

Observou-se, ainda, uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre o conteúdo de proteínas totais e o conteúdo de compostos fenólicos totais (0,498), bem como entre o teor de prolina e compostos fenólicos (0,711) ou de flavonóides totais (0,629) (Tabela 7). A correlação positiva entre os conteúdos protéicos e de aminoácidos livres (expresso por concentração de prolina), e tais compostos fenólicos, está diretamente relacionada com a síntese destes compostos, uma vez que a prolina regula os níveis de $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}_2$ necessários para metabolismo purínico das pentoses fosfato, estimulando a produção de compostos fenólicos, derivados do ácido shiquímico via biossíntese do aminoácido fenilalanina (SHETTY, 2004; ARAUJO, 2008).

Segundo o manual “*HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION*”, o conteúdo de prolina em mel não deve ser inferior a 18 mg.100 g⁻¹, sendo este utilizado para avaliação da qualidade, estimando-se o grau de maturidade do mel e a detecção de adulteração por sacarose comercial (BOGDANOV, 2002), isto é, quando não for detectada prolina, o produto provavelmente foi adulterado com xarope açucarado. No entanto, esse limite é relacionado ao mel de *A. mellifera*, não atendendo as particularidades dos méis de abelhas nativas, uma vez que não há legislação específica.

Em méis de *A. mellifera* de diferentes origens florais, observou-se uma variação de 437,8 a 2169,4 eq. mg de prolina.Kg⁻¹, com média de $980,95 \pm 400,74$ eq. mg de prolina .Kg⁻¹ (MEDA *et al.* 2005). Cotte *et al.* (2004) avaliaram os aminoácidos livres em mel de abelhas africanizadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e confirmando que o principal aminoácido livre do mesmo é a prolina.

Dois sistemas de extração de aminoácidos livres de mel foram testados através de hidrólise ácida: um direto através do extrato aquoso com ácido fórmico (BOGDANOV, 2002), e outro a partir dos extratos protéicos previamente obtidos por suave precipitação ácida (OLIVEIRA, 2006). Com relação à resolução do perfil cromatográfico (CCD) dos aminoácidos livres e à quantificação de prolina, verificou-se que o primeiro método (hidrólise com ácido fórmico 98%) foi mais elucidativo. As Figuras 26 e 27 apresentam os perfis em CCD desses extratos, sendo eles comparados com os padrões de glicina, prolina e arginina submetidos ou não (Figura 26) ao mesmo protocolo da hidrólise ácida. A submissão dos padrões à hidrólise (Figura 27) ácida mostrou-se mais correta, confirmando que todas as amostras apresentaram uma banda com $R_f = 0,15$ (Figura 27), similar aos padrões utilizados.

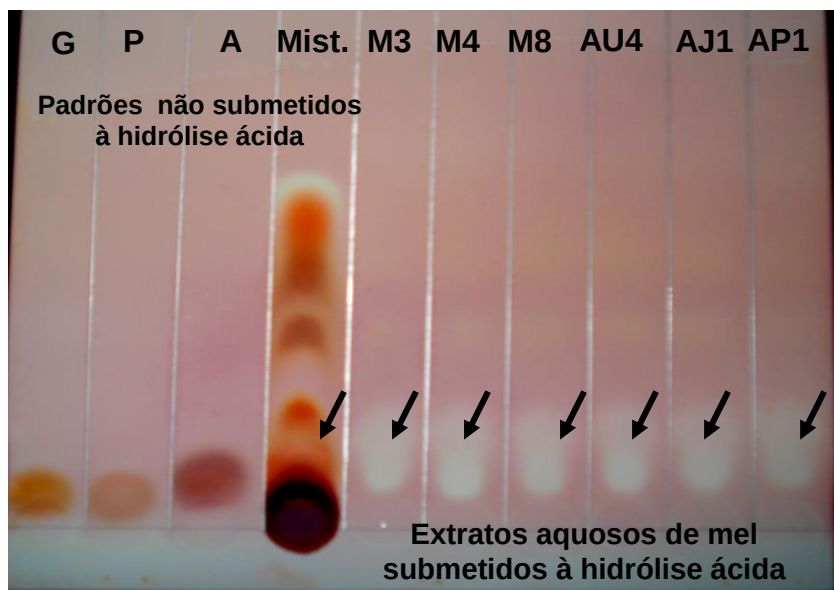


FIGURA 26 – Perfil cromatográfico em camada delgada (sílica gel 60) de aminoácidos livres de mel de *A. mellifera* e de abelhas nativas do Estado de Alagoas (estação seca de 2008/09), a partir de extrato aquoso de méis hidrolisados com ácido fórmico (revelação ninidrina e aquecimento 105°C). P= prolina; G= glicina; A= arginina; M3-8: *A. mellifera*; AU4: *M. scutellaris*; AJ1: *M. subnitida* AP1: *Plebeia* sp.

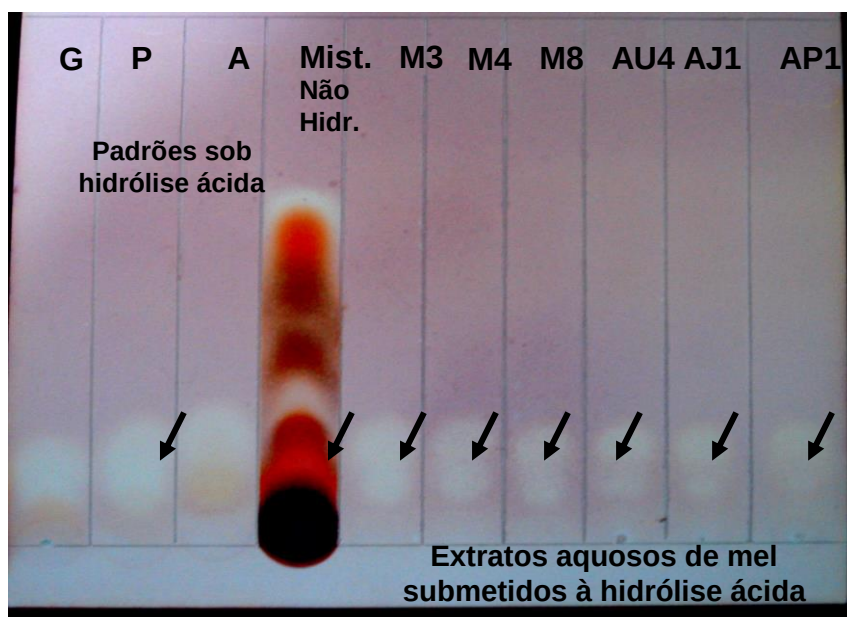


FIGURA 27 - Perfil cromatográfico em camada delgada (sílica gel 60) de aminoácidos livres de mel de *A. mellifera* e de abelhas nativas do Estado de Alagoas (estação seca de 2008/09), a partir de extrato aquoso de méis hidrolisados com ácido fórmico (revelação ninidrina e aquecimento 105°C), bem como os padrões de aminoácidos de prolina (P), glicina (G) e arginina (A). M3-8: *A. mellifera*; AU4: *M. scutellaris*; AJ1: *M. subnitida* AP1: *Plebeia* sp.

5.2.7 – Determinação de Diastase

A composição enzimática de qualquer mel está diretamente relacionada às fontes vegetais e entomológicas das quais ele é derivado (CRANE, 1983). Este fato dificulta a proposição de uma única norma para todo o Brasil, país rico em espécies de meliponíneos e caracterizado por um grande mosaico de habitats e formações vegetais. Ao mesmo tempo, são escassas as informações nesse sentido e específicas dos méis de todo o país (VILLAS-BÔAS & MALASPINA, 2005).

A legislação brasileira (BRASIL, 2000) estabelece um valor mínimo de atividade diastásica de 8 Gothe (G) para classificação do mel de boa qualidade. Os resultados obtidos nas amostras de méis de *A. mellifera* revelam que, no tocante a esse parâmetro, com exceção da amostra M7 (4,5 G), todas as demais possuem boa qualidade (variação de 4,50-51,45 G, média de $24,87 \pm 12,06$ G).

No entanto, ocorreu diferença estatisticamente significativa quanto ao conteúdo de diastase (Tabela 6) nos méis de abelhas nativas. Em méis de *M. scutellaris*, o índice de diastase variou de 2,39 a 18,60 G (média de $5,87 \pm 4,07$ G). Já nos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp, esse índice variou respectivamente de 2,07-28,30, 4,68-8,36 e 16,71-19,20 G. Isso significa que se a mesma legislação de méis de abelhas africanizadas estivesse vigorando para méis de nativas, apenas as amostras com índice de diastase menor do que 8G estariam fora dos padrões de qualidade. Porém, uma vez que a acidez desses méis não foi alta na maioria das amostras (exceto para AU10, 15-AU18, AU21-22), o suficiente para destruir tal enzima (VILHENA & ALMEIDAMURADIAN, 1999; MARCHINI & SOUZA, 2006), é possível que os mesmos apresentassem baixas concentrações de maltose e oligossacarídeos indutores da expressão da diastase, corroborando a necessidade de uma legislação específica para tais méis de abelhas nativas. Observou-se ainda uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre o conteúdo de diastase e proteínas totais (0,325) e entre o conteúdo de diastase e teor de prolina (0,803), $p < 0,01$, Tabela 7.

O conteúdo de diastase de méis paulistas produzidos por diferentes espécies de meliponíneos variou entre 3,16 e 54,11 G, média 28,19 G (ALMEIDA-ANACLETO, 2007), no entanto, em alguns estudos méis de abelhas do gênero *Melipona* este enzima esteve ausente ou em baixa concentração (SOUZA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009),

5.2.8 – Determinação de Hidroxi-Metil-Furfuraldeído (HMF)

No que se refere ao teor de HMF, ocorreu diferença estatisticamente significativa (p

< 0,05) entre os diferentes méis (Tabela 6), variando este entre 1,5 e 128,2 mg. Kg⁻¹ (média de 45,97 ± 37,52 mg. Kg⁻¹) nos méis de *A. mellifera*. Destes, 4 amostras de mel comercial excederam o limite permitido pela legislação, que é de no máximo 60 mg. Kg⁻¹.

Em relação aos méis de *M. scutellaris*, o conteúdo de HMF variou de 0-80,1 mg.Kg⁻¹, (média de 13,20 mg. Kg⁻¹), enquanto nos de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp a média deste foi respectivamente de 7,46 , 4,4 e 21 mg. Kg⁻¹ de mel. Apenas uma amostra de mel de *M. scutellaris* (AU14) excedeu o limite desse parâmetro permitido pela legislação para méis de abelhas africanizadas.

Uma pequena quantidade de HMF é encontrada em méis recém-colhidos, no entanto, o conteúdo de HMF no mel pode ser afetado pela acidez, pH, conteúdo de água e minerais, além de condições de armazenamento, especialmente elevadas temperaturas (VILHENA & ALMEIDA-MURADIAN, 1999; BOGDANOV, 2002; MARCHINI & SOUZA, 2006). Valores elevados de HMF encontrados nos méis de meliponíneos podem estar associados às técnicas inadequadas de manejo e/ou condições climáticas adversas da região (SOUZA *et al.*, 2006; SOUZA, 2008).

5.2.9 – Determinação da Cor

Em relação à coloração, parâmetro considerado essencial para agradar o consumidor do mel, as amostras de *A. mellifera* oscilaram de 23,3 a 108,0 mm Pfund, variando do branco ao âmbar, sendo a média de 56,31± 26,79 mm Pfund (âmbar claro) (Tabela 3). Méis de *M. scutellaris* apresentaram coloração oscilando entre 27,4 e 196,4 mm Pfund, variando do branco ao âmbar escuro (média de 104,79 ± 52,53 mm Pfund = âmbar). Quanto aos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp a variação de coloração foi respectivamente de 45,6-264,0, 39,7-51,2 e 199,0-249,1 mm Pfund, sendo o mel de *Plebeia* sp diferenciado, pois apresentou uma coloração âmbar escuro em todas as amostras avaliadas (Figura 28).

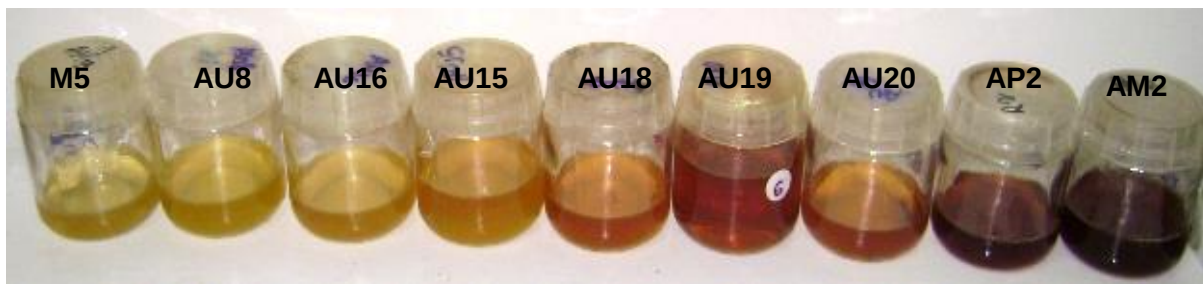


FIGURA 28 – Variação de coloração de méis de diferentes origens entomológicas produzidos em Alagoas na estação de seca 2008/09. M5: *A. mellifera*; AU: *M. scutellaris*; AP2: *Plebeia* sp; AM2: *M. quadrifasciata*.

Nos mercados mundiais o mel é avaliado por sua cor, sendo que méis mais claros alcançam preços mais elevados (ALVES *et al.*, 2005), estando essa propriedade organoléptica relacionada com a origem floral, processamento, armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo de néctar e a temperatura na qual o mel é produzido no interior da colméia (ALMEIDA-ANACLETO, 2007; BOGDANOV *et al.*, 2004).

Turkmen *et al.* (2006) observaram que o tratamento térmico de mel levou ao escurecimento, provocado pela formação de produtos da reação de *Maillard*, como melanoidinas e HMF, alterações estas indesejáveis ao consumidor.

5.3 – Avaliação antioxidante de méis de abelhas nativas e africanizadas

5.3.1 – Determinação de Fenóis Totais

Com relação ao conteúdo de fenóis totais (Tabela 6), verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes méis. Os méis de *A. mellifera* apresentaram concentração média de fenóis totais de $92,34 \pm 13,55$ eq. mg de ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, sendo esta superior à de méis de nativas, exceto em relação aos de *Plebeia* sp.

No tocante ao mel de *M. scutellaris*, a variação de fenóis totais foi de 39,3-85,7 eq. mg ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (média de $51,92 \pm 12,36$ eq. mg. ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de mel). Méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp apresentaram respectivamente $63,92 \pm 45,61$, $42,70 \pm 3,60$ e $106,01 \pm 9,85$ eq. mg ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, Figura 29. A maior variação ocorreu entre méis de *M. quadrifasciata*, especialmente no que se refere à amostra AM2, que também apresentou coloração mais escura, que conforme Beretta *et al.* (2005), em geral méis escuros apresentam maior teor de compostos fenólicos.

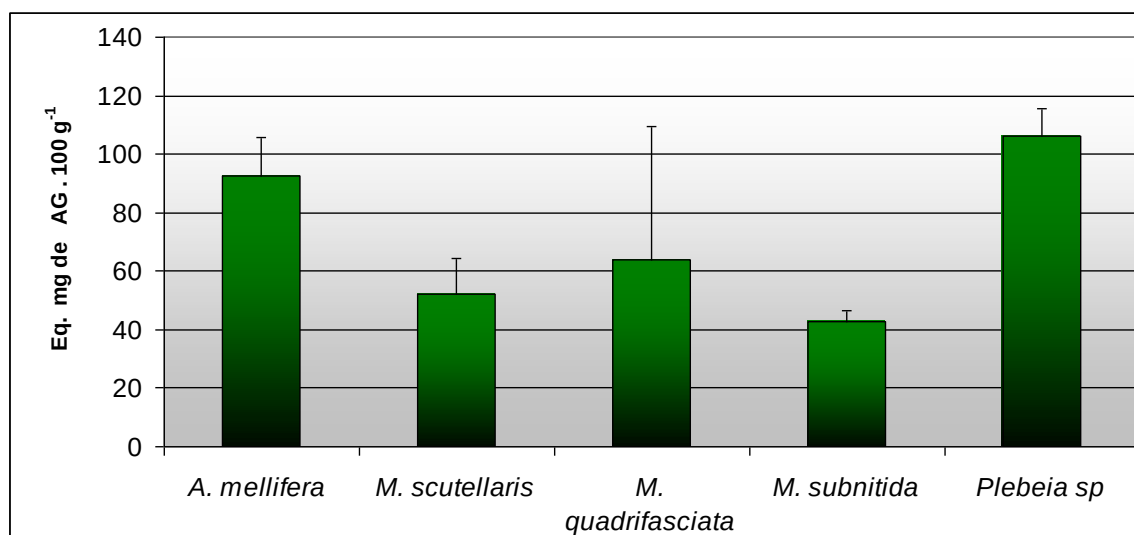


FIGURA 29 – Conteúdo de fenóis totais [equivalentes mg de ácido gálico (AG). 100 g⁻¹] em méis de abelhas nativas e africanizadas produzidos em Alagoas na estação de seca 2008/09.

Resultados semelhantes para mel floral de *A. mellifera* foram encontrados por Al *et al.* (2009), Al-Mamary *et al.* (2002); Aljadi & Kamaruddin (2004) e Beretta *et al.* (2005). Meda *et al.* (2005), analisando mel de abelhas africanizadas, detectaram um conteúdo de fenóis totais variando de 32.59-114.75 eq. mg ácido gálico.100 g⁻¹, sendo que tais autores observaram que méis de melato apresentaram mais fenóis do que méis florais. No entanto, em relação a méis de abelhas nativas os dados são escassos, sendo de fundamental importância estudos que contribuam para elucidação da real contribuição destes compostos para o perfil terapêutico deste alimento.

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de bloqueadores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autooxidação, e, portanto, da oxidação lipídica em tecidos vegetais e animais. Assim, quando incorporados na alimentação humana, não apenas são conservantes dos alimentos, mas também reduzem o risco de desenvolvimento de patologias como arteriosclerose e câncer (ANGELO & JORGE, 2007). São oriundos do metabolismo secundário das plantas, e essenciais para o seu crescimento e reprodução, além de combaterem infecções, ferimentos, efeitos das radiações UV, dentre outros. Portanto, sua detecção auxilia na identificação da origem botânica do mel (BOGDANOV, 2002; ANGELO & JORGE, 2007).

O método de Folin-Ciocalteu é amplamente utilizado em ensaios de quantificação de compostos fenólicos totais em diferentes alimentos, mas apesar disso, a metodologia

que envolve a mistura dos ácidos fosfomolibdato-fosfotungstato, pode sofrer interferência de outros compostos não fenólicos, como ácido ascórbico e alguns aminoácidos, dentre eles a tirosina (FERREIRA *et al.*, 2009).

5.3.2 – Flavonóides Totais

O conteúdo de flavonóides totais também apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes méis (Tabela 6), variando de 11,69-49,50 eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ nos méis *A. mellifera* (média de $28,27 \pm 9,40$ eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) e de 7,94-29,51 eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (média de $17,93 \pm 4,60$ eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) nos méis de *M. scutellaris* (Figura 30).

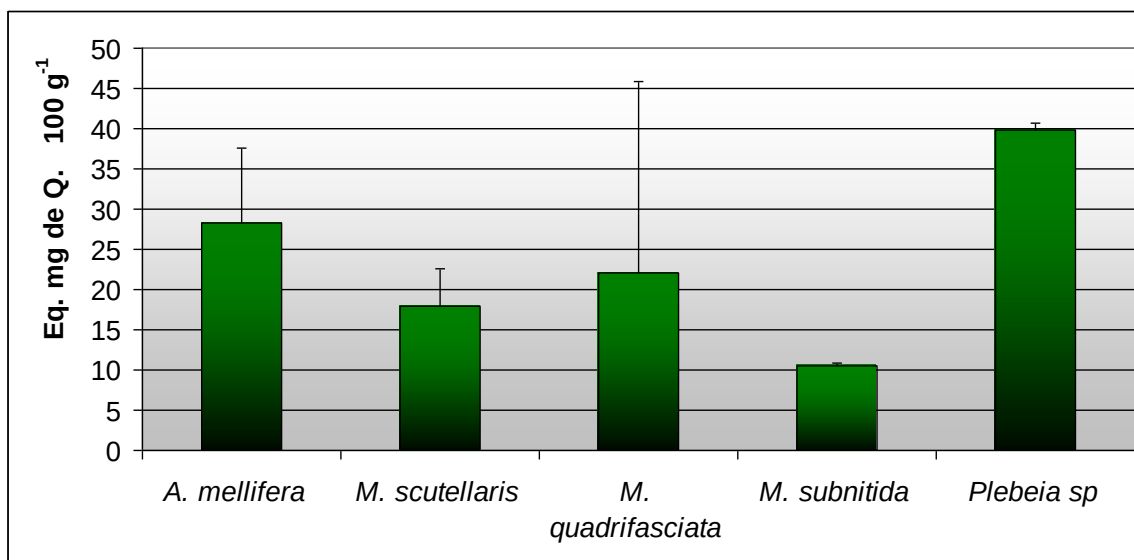


FIGURA 30 – Conteúdo de flavonóides totais (equivalentes mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) em méis de abelhas nativas e africanizadas produzidos em Alagoas na estação de seca 2008/09.

No entanto, os méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia sp* apresentaram teor de flavonóides totais oscilando respectivamente de 7,63-49,50, 10,44-10,76 e 39,19-40,44 eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Observou-se ainda uma correlação estatisticamente significativa (0,803) entre o conteúdo de flavonóides e o de fenóis totais (Tabela 7).

Al *et al.* (2009), empregando a mesma metodologia de determinação de flavonóides do presente estudo, observaram teor de flavonóides totais variando de 0,28 e 28,25 eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de mel. Por outro lado, Meda *et al.* (2005), analisando méis florais e de melato de *A. mellifera*, com a metodologia espectrofotométrica utilizada no presente

estudo, observaram teor de flavonóides totais variando de 0,17-8,35 eq. mg quercetina.100 g⁻¹, valores inferiores aos do presente estudo.

Alguns estudos empregando a extração da fração de substâncias fenólicas por cromatografia em coluna usando a resina Amberlite XAD-2 (poro 9 nm e partícula 0,3–1,2 mm) e CLAE, também relatam um teor de flavonóides totais inferior ao do presente estudo, principalmente devido à extração da matriz, uma vez que os interferentes são reduzidos. Segundo LIANDA (2009), o êxito de uma análise cromatográfica para uma amostra com uma matriz tão complexa como o mel, depende, além de outros fatores, do preparo adequado da amostra, onde são eliminados ao máximo, os possíveis interferentes da análise, efetuando-se apenas a extração das substâncias de interesse, neste caso a fração rica em substâncias fenólicas (IURLINA *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2009). Truchado *et al.* (2009) avaliando méis de *A. mellifera* de diferentes origens florais e geográficas isolaram os flavonóides pinobanksina, pinocembrina, miricetina, tricetina, quercetina, leutolina, kaempferol, apigenina, metilquercetina, chrisina, galangina.

Iurlina *et al.* (2009) realizaram a extração de flavonóides agliconas (miricetina, quercetina e luteolina) de mel de *A. mellifera* em resina Amberlite XAD-4 e quantificaram por CLAE estes compostos fenólicos em méis de três regiões geográficas da Argentina. O conteúdo de flavonóides agliconas variou consideravelmente de acordo com a origem botânica e geográfica, podendo, segundo estes autores, estes três flavonóides servir de marcadores químicos para determinação da origem fitogeográfica do mel argentino.

5.3.3 – Atividade Antioxidante pela captura do radical DPPH

Há, atualmente, um crescente interesse da indústria alimentícia por antioxidantes naturais, devido à comprovada ação dos efeitos deletérios sobre o fígado e da marcada proliferação do retículo endoplasmático, entre outras alterações causadas pelo emprego de doses elevadas dos antioxidantes sintéticos em alimentos, em especial do butil-hidroxitolueno (BHT) e butil hidroxianisol (BHA), (ARAUJO, 2008; BORSATO, 2008).

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. O método DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) é baseado na captura do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm.

Em relação ao conteúdo de antioxidantes pelo método de captura do radical DPPH, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os méis de diferentes origens entomológicas, variando entre 6,32 e 17,20 eq. mg de quercetina .100 g⁻¹ de mel de *A.*

mellifera (média de $11,44 \pm 2,43$ eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Já no mel de *M. scutellaris*, esse conteúdo variou entre 0,30 e 8,85 eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (média de $5,07 \pm 2,15$ eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$). No entanto, no tocante aos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *P. droryana*, o conteúdo de antioxidantes variou respectivamente de 6,32-15,00, 5,66-6,79 e 5,09-17,60 eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (médias respectivamente de $9,24 \pm 4,98$, $6,22 \pm 0,79$ e $11,34 \pm 8,84$ eq. mg de quercetina $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

Quando o padrão de antioxidantes utilizado foi o ácido gálico, o teor de antioxidantes em mel de *A. mellifera* variou entre 5,48-13,23 eq. mg de ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, enquanto que o mel de *M. scutellaris* variou de 0,06-7,86 eq. mg de ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$. No entanto, no tocante aos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida*, *Plebeia* sp, o conteúdo de antioxidantes variou de 5,48-11,63, 5,01-5,81 e 4,61-13,50 eq. mg de ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Foram observadas correlações estatisticamente significativas ($p < 0,01$) entre o conteúdo de fenóis e DPPH AG (0,541), DPPH Q (0,537), além do conteúdo de flavonóides e DPPH AG (0,537), DPPH Q (0,534), Tabela 7. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada, geralmente, pelo número de hidroxilas presentes na molécula, embora outros fatores possam contribuir para tal atividade. Por exemplo, a dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico ($-\text{HC}=\text{CH}-\text{COOH}$) participa da estabilidade do radical por ressonância do deslocamento do elétron desemparelhado, permitindo que os derivados do ácido cinâmico, como os ácidos sináptico e ferúlico sejam antioxidantes mais ativos que os derivados do ácido benzóico, como os ácidos siríngico e vanílico (ANGELO & JORGE, 2007; BORSATO, 2008).

Além dos compostos fenólicos presentes no mel, outros compostos possuem atividade antioxidante, a saber, antioxidantes enzimáticos, dentre eles, as enzimas catalase, glicose oxidase e peroxidase, além das substâncias não enzimáticas, como ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenóides, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos e produtos da reação de Maillard (AL-MAMARY *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2009).

Ferreira *et al.* (2009) avaliaram as propriedades antioxidantes de mel de *A. mellifera* in natura e do extrato fenólico obtido em coluna com resina XAD-2, porosidade 9 nm, produzido em regiões montanhosas de Portugal, por meio do método de sequestro do radical DPPH, redução do Fe^{3+} pelo FRAP, inibição da peroxidação lipídica e branqueamento do β -caroteno. Os mesmos autores observaram o coeficiente de correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos totais (mel in natura) e compostos antioxidantes

expresso por DPPH de 0,915, enquanto que o coeficiente de correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos (extraído com XAD-2) e DPPH foi de 0.982. Além disto, os mesmos autores observaram que méis escuros de apresentaram maior conteúdo de compostos antioxidantes, dentre eles, o teor de flavonóides totais foi de 58,74 mg . 100 g⁻¹, ácido ascórbico 14,58 mg . 100g⁻¹ e β -caroteno 0,95 mg . 100 g⁻¹.

Conforme estudos de Beretta *et al.* (2005), correlações significativas foram observadas para os marcadores de atividade antioxidante em mel com diferentes métodos, variando esta de 0,933 a 0,716, e há uma estreita correlação entre antioxidantes, conteúdo de fenóis e intensidade de cor do mel. Os resultados dessas pesquisas demonstraram que somente através da combinação desses testes e da determinação dos teores de fenóis totais é que se pode alcançar uma rigorosa caracterização do potencial antioxidante do mel, auxiliando esta na compreensão de suas propriedades biológicas e possíveis aplicações terapêuticas.

Com relação à obtenção do perfil cromatográfico (CCD) de soluções metanólicas dos méis estudados, visando avaliação de componentes com atividade antioxidante, estes foram desenvolvidos no sistema de solventes CHCl₃: CH₃OH: C₃H₇OH: H₂O (6:5:1:4 v:v:v:v). As manchas foram intensificadas na presença de vapores de amônia (Figura 31), e comparadas com padrões de quercetina, rutina, catequina, ácido gálico, ácido salicílico e ácido tânico, sob luz visível ou UV longo (365 nm) ou UV curto (254 nm). Sob luz visível, todos os padrões, exceto de ácido salicílico, que tornou-se lilás bem claro, assumiram coloração amarelo-alaranjado forte, enquanto as bandas extensas e iguais observadas nas amostras de mel de abelhas nativas ou africanizadas apresentaram coloração violeta forte sob a sílica gel 60 com indicador para fluorescência. Sob radiação UV curta, no entanto, tais bandas tornaram-se fluorescentes, embora o mesmo não tenha ocorrido com os padrões testados.

Da mesma forma, a aspersão dos cromatogramas assim obtidos com solução alcoólica de AlCl₃ (10%) também revelou as bandas antioxidantes (Figura 33a) com coloração amarelada contra um fundo azulado, porém, este clareou após sua secagem, demonstrando que a revelação com DPPH é mais eficiente para identificação de compostos antioxidantes em cromatofolhas de sílica gel 60.

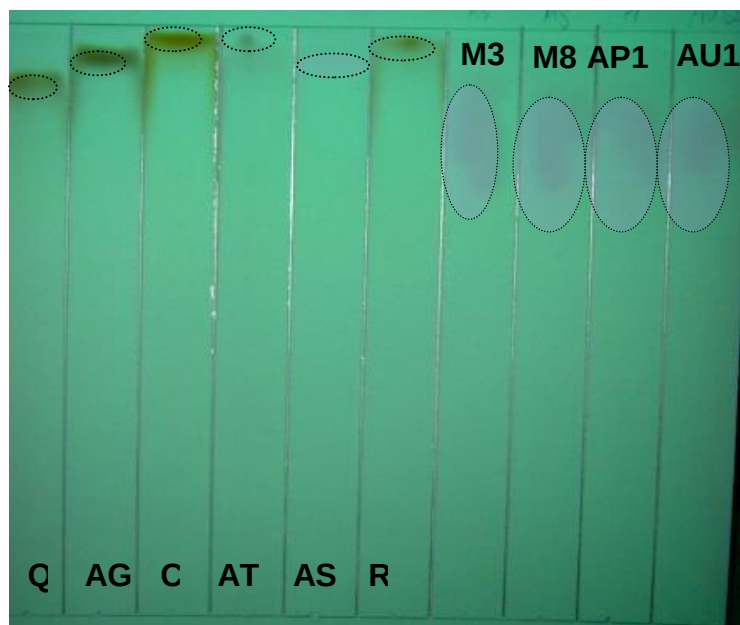


FIGURA 31 – Perfil cromatográfico (CCD em sílica gel 60, $F_{254\text{ nm}}$) de antioxidantes de mel de abelhas nativas e africanizadas, coletado no Estado de Alagoas durante a estação seca de 2008/09. As bandas foram intensificadas com vapor de amônia e observadas sob luz visível. Q: Quercetina; AG: Ácido Gálico; C: Catequina; AT: Ácido Tânico; AS: Ácido Salicílico; M3-8: mel de *A. mellifera*; AP1: mel de *Plebeia* sp; AU12: mel de *M. scutellaris*.

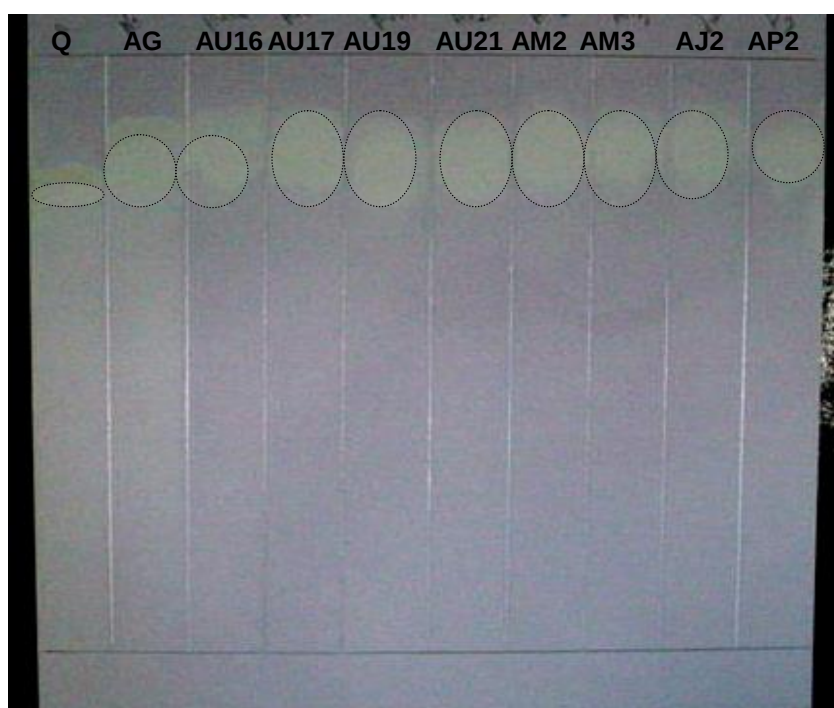


FIGURA 32 – Perfil cromatográfico (CCD em sílica gel 60, $F_{254\text{ nm}}$) de antioxidantes de mel de abelhas nativas, coletado no Estado de Alagoas durante a estação seca de 2008/09. As bandas foram reveladas com solução metanólica de DPPH (0,2%) e observadas sob luz visível. Q: Quercetina; AG: Ácido Gálico; AU16-21: mel de *M. scutellaris*; AM2-3: mel de *M. quadrifasciata*; AJ2: mel de *M. subnitida*; AP2: mel de *Plebeia* sp.

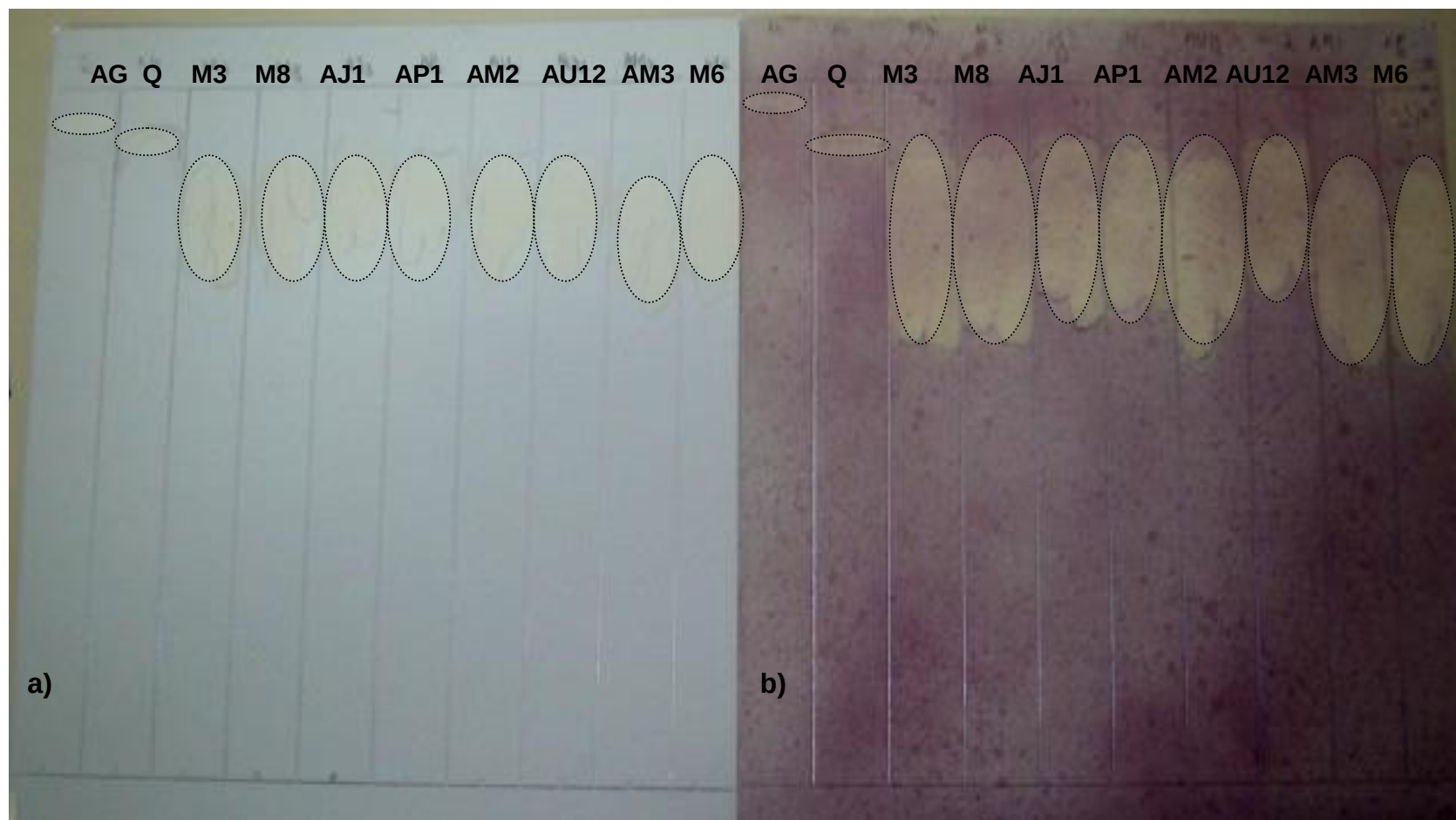


FIGURA 33 – Perfil cromatográfico (CCD em sílica gel 60, $F_{254\text{ nm}}$) de antioxidantes de mel de abelhas africanizadas e nativas, coletado no Estado de Alagoas durante a estação seca de 2008/09. As bandas foram reveladas com: **a)** solução alcoólica de AlCl_3 (10%); **b)** metanólica de DPPH (0,2%), e observadas sob luz visível. AG: Ácido Gálico; Q: Quercetina; M3-8: *A. mellifera*; AU16-12: mel de *M. scutellaris*; AM2-3: mel de *M. quadrifasciata*; AJ1: mel de *M. subnitida*; AP1: mel de *Plebeia* sp.

5.3.4 – Poder antioxidante de redução de ferro (FRAP)

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes méis em relação ao poder antioxidante, expresso pela redução de $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$. O mel de *A. mellifera* apresentou conteúdo antioxidante por tal método variando entre 19,00 e 73,27 eq. mg de ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (média $48,31 \pm 14,80$ 27 eq. mg de ácido gálico $\cdot 100 \text{ g}^{-1}$), Figura 34.

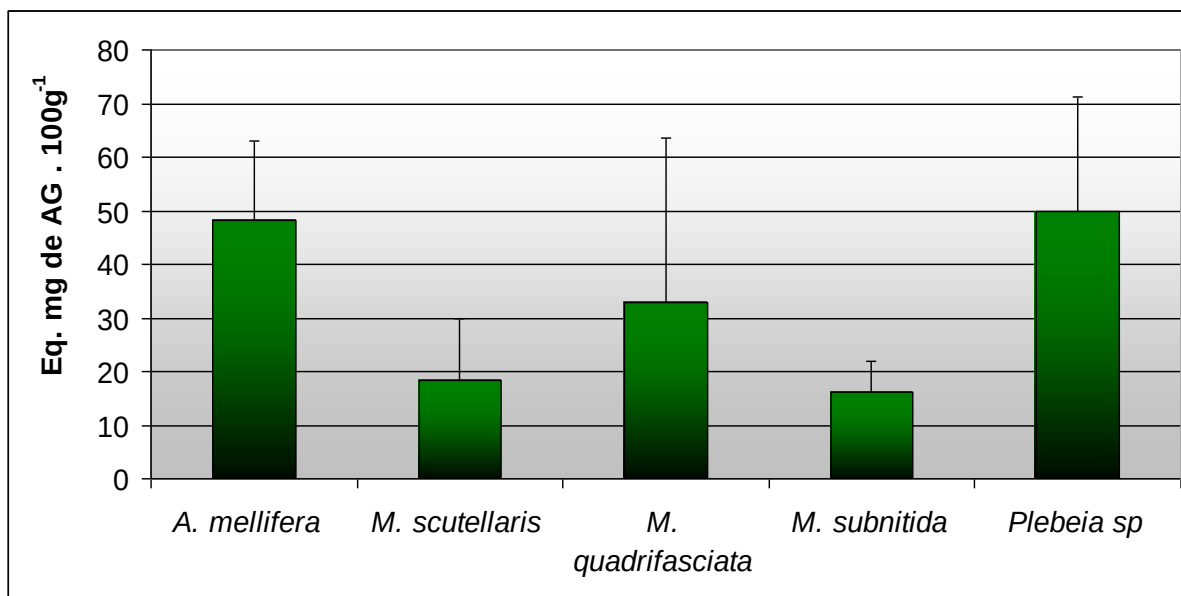


FIGURA 34 – Conteúdo de antioxidantes [equivalentes mg de ácido gálico (AG). 100 g⁻¹] pelo método FRAP, em mel de abelhas nativas e africanizadas coletados no Estado de Alagoas durante a estação seca de 2008/09.

No que se refere ao mel de *M. scutellaris*, a variação foi de 4,67-52,56 eq. mg de ácido gálico.100 g⁻¹ (média de $18,45 \pm 11,41$ eq. mg de ácido gálico.100 g⁻¹), isto é, valores inferiores aos obtidos para mel de *Apis*. Quanto aos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia sp*, as médias foram de $32,96 \pm 30,67$, $16,19 \pm 5,76$ e $49,91 \pm 21,36$ eq. mg de ácido gálico.100 g⁻¹ (Figura 34).

Correlações estatisticamente significativas ($p < 0,01$) foram observadas entre o conteúdo de fenóis totais e FRAP (0,814) e entre o conteúdo de flavonóides totais e FRAP (0,795), evidenciando novamente a contribuição destes compostos na atividade antioxidante do mel. Beretta *et al.* (2005) observaram uma correlação positiva (0,885) entre o teor de compostos fenólicos de méis florais de *A. mellifera* e atividade antioxidante expresso por FRAP, corroborando o observado no presente estudo. Houve ainda,

correlação estatisticamente significativa entre o conteúdo de antioxidantes expresso por FRAP e o conteúdo de antioxidantes expresso por DPPH AG (0,584) e DPPH Q (0,584) (Tabela 8).

Kuçük *et al.* (2007), avaliando a atividade antioxidante de mel de *A. mellifera*, de diferentes origens florais, pelo ensaio FRAP, detectaram valores semelhantes aos obtidos no presente estudo.

5.4 – Detecção de *Clostridium* sp

Quanto à presença de esporos de *Clostridium* sp nos méis avaliados, observou-se que as amostras M2, M4, M6, M7, M8, M12, AU14, AU15, AU16, AU17, AM1, AM3, AP1 e AP2 levaram o meio de cultura CMM adicionado de solução de água peptonada e dessas amostras à turvação após choque térmico (Quadro 4). Além disso, tais amostras foram submetidas ao teste de catalase para diferenciação entre os gêneros *Clostridium* e *Bacillus*. Aquelas que manifestaram-se catalase positivas, após apresentarem turvação em meio CMM (Figura 35), foram semeadas em ágar Reinforced, e a morfologia de suas células coradas por Gram (Figura 36) antes de seu cultivo em caldo BHI. Apenas as amostras de mel de *M. scutellaris* AU15 e AU17 apresentaram características de contaminação por *Clostridium*. Os testes bioquímicos efetuados (Tabela 8, Figura 37) confirmaram a presença do gênero nessas amostras.

Dentre as 43 amostras de méis avaliadas (14 de *A. mellifera* e 29 de meliponíneos), apenas 2 (4,6%) apresentaram isolados característicos do gênero *Clostridium*, estando abaixo do observado por Nevas *et al.* (2005); Nevas (2006); Finola *et al.* (2007); Ragazani *et al.* (2008). Segundo Cereser *et al.* (2008), a incidência de esporos de *C. botulinum* em mel variou de 4 a 25%.

QUADRO 4 – Resultados dos testes visando identificação de bastonetes de *Clostridium* sp. ou *Bacillus* sp. em amostras de mel de diferentes abelhas africanizadas e nativas coletadas no estado de Alagoas, durante a estação seca de 2008/09.

Amostras	Turvação do meio CMM	Catalase
M1	-	-
M2	Sim	Positivo
M3	-	-
M4	Sim	Positivo
M5	-	-
M6	Sim	Positivo
M7	Sim	Positivo
M8	Sim	Positivo
M9	-	-
M10	-	-
M11	-	-
M12	Sim	Positivo
M13	-	-
M14	-	-
AU1	-	-
AU2	-	-
AU3	-	-
AU4	-	-
AU5	-	-
AU6	-	-
AU7	-	-
AU8	-	-
AU9	-	-
AU10	-	-
AU11	-	-
AU12	-	-
AU13	-	-
AU14	Sim	Positivo
AU15	Sim	Negativo*
AU16	Sim	Positivo
AU17	Sim	Negativo*
AU18	-	-
AU19	-	-
AU20	-	-
AU21	-	-
AU22	-	-
AM1	Sim	Positivo
AM2	-	-
AM3	Sim	Positivo
AJ1	-	-
AJ2	-	-
AP1	Sim	Positivo
AP2	Sim	Positivo

- não houve crescimento microbiano, conseqüente turvação do meio de cultivo; * culturas submetidas à identificação no sistema API-20E e API-Staph (Biomerieux, França).

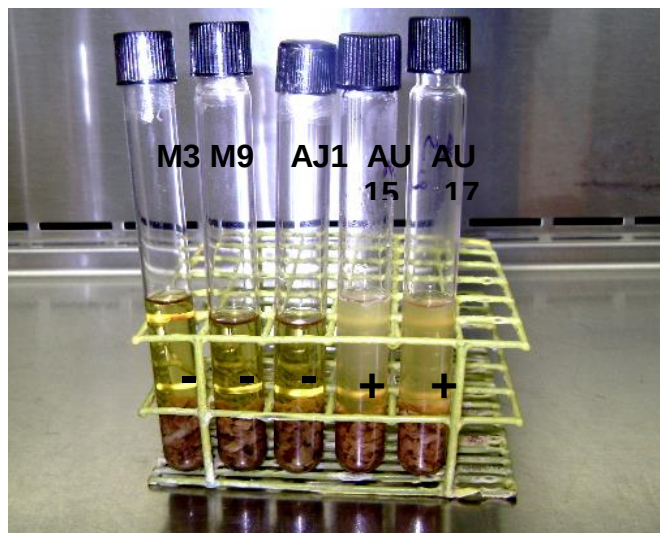


FIGURA 35 – Turvação do meio de cultivo CMM, inoculado com amostras de mel de abelhas nativas (AJ1, AU15, AU17) e africanizadas (M3, M9), coletadas no Estado de Alagoas, durante a estação de seca 2008/09.

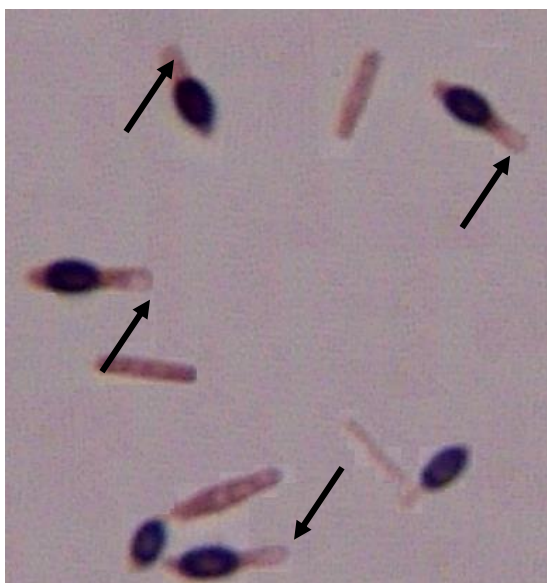


FIGURA 36 – Aspecto morfológico do bacilo Gram positivo com endósporo terminal e subterminal isolado de amostras de mel de abelha nativa coletada no Estado de Alagoas na estação seca de 2008/09.

TABELA 8. Resultados dos testes bioquímicos do sistema API 20E e API-Staph (Biomérieux), inoculados com a amostra AU15 e AU17 de mel de abelhas nativas coletado no Estado de Alagoas, durante a estação de seca 2008/2009, 24h após incubação a 37 °C, ao abrigo da luz.

Amostras			AU15	AU17
Sigla	Substratos Descrição	Reações		
ONPG	2-nitrofenil-d-galactopiranosídeo	β -galactosidase	-	-
ADH	L-arginina	arginina desidrolase	-	-
LDC	L-lisina	lisina descarboxilase	-	-
ODC	L-ornitina	Ornitina descarboxilase	-	-
CIT	Citrato de sódio	Utilização de citrato	-	-
H₂S	Tiosulfato de sódio	Produção de H ₂ S	-	-
URE	Uréia	Hidrólise de uréia	-	-
TDA	L-triptrofano	deaminase	-	-
IND	L-triptrofano	Produção de indol	-	-
VP	Piruvato de sódio	Produção de acetoina	-	-
GEL	Gelatina	gelatinase	+	+
GLU	D-glucose	Oxidação/Fermentação	+	+
MAN	manitol	Oxidação/Fermentação	+	+
INO	Inositol	Oxidação/Fermentação	+	+
SOR	D-sorbitol	Oxidação/Fermentação	+	+
RHA	L-ramnose	Oxidação/Fermentação	+	+
SAC	D-sacarose	Oxidação/Fermentação	+	+
MEL	D-melibiose	Oxidação/Fermentação	+	+
AMY	Amigdalina	Oxidação/Fermentação	+	+
ARA	L-arabinose	Oxidação/Fermentação	+	+
OX	Oxidase	Oxidase	-	-
NO₂	Nitrato	Nitrato redutase	-	-
N₂	Nitrogênio	Assimilação de N ₂	-	-
MacC	Mac Conkey	lactase	-	-
XIL	D - xilose	fermentação	+	+
MDG	Metil α ,D- glucopiranosídeo	fermentação	+	+
NAG	N – acetil – glucosamina	fermentação	+	+
TRE	D – trehalose	fermentação	+	+
XLT	Xilitol	fermentação	+	+
Lac	Lactose	fermentação	+	+
NIT	Nitrato de potássio	Nitrato redutase	-	-
PAL	β – naftil fosfato	Fosfatase alcalina	-	-
TRE	D – trealose	fermentação	+	+

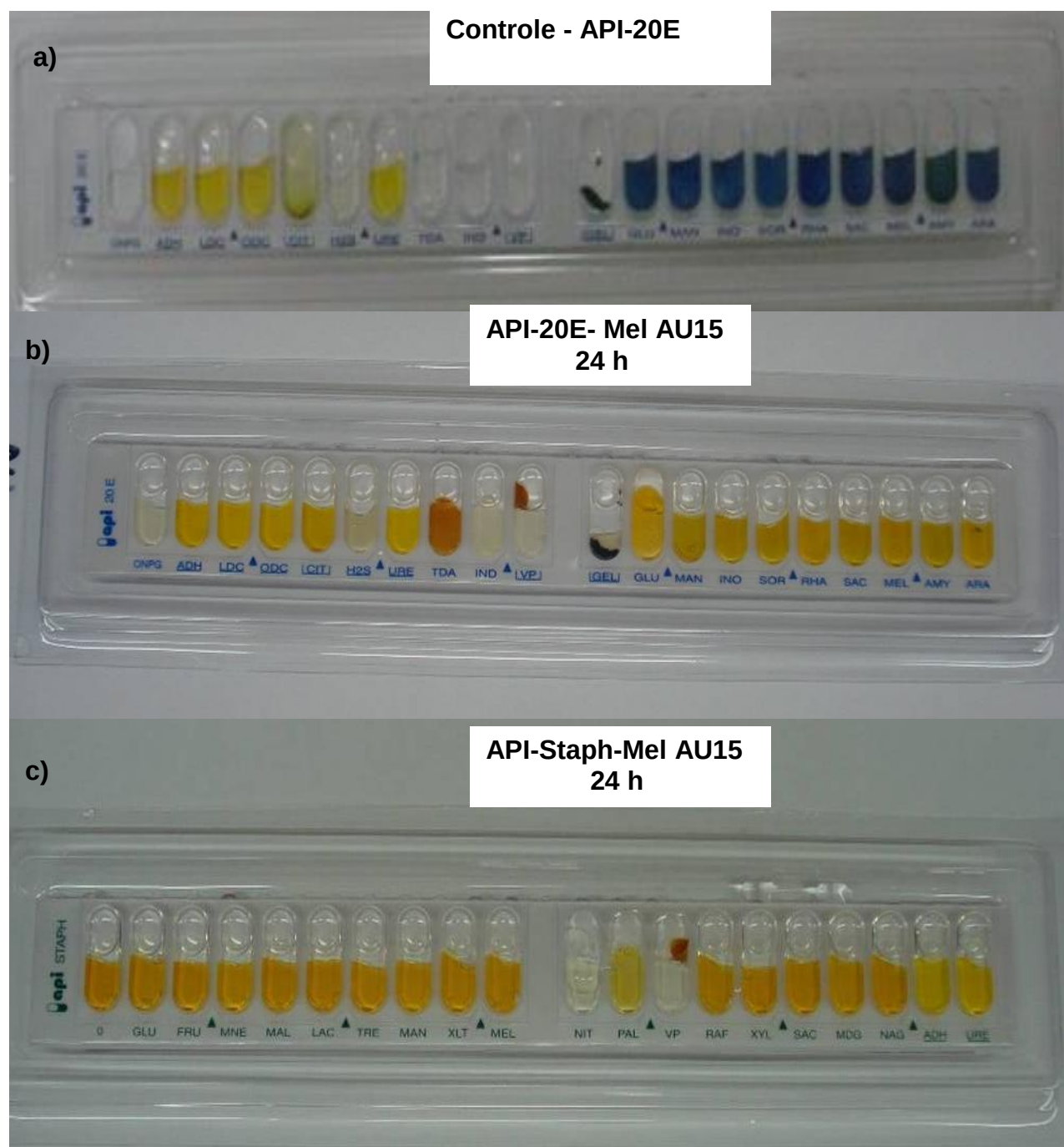


FIGURA 37 – Aspecto dos resultados dos testes bioquímicos nos sistemas rápido API 20E **a)** controle; **b)** teste e API-Staph **c)** (Biomerieux), inoculados com a amostra AU15 de mel de abelhas nativas coletado no Estado de Alagoas, durante a estação seca de 2008/09, 24 h após incubação a 37 °C, ao abrigo da luz.

Provavelmente, a presença de esporos de *Clostridium* sp em duas amostras de méis de *M. scutellaris* avaliadas se deva a contaminação primária, associada à contaminação por esporos oriundos da via digestiva da abelha, de fatores ambientais, além de animais próximos ao apiário e o solo contaminado (SNOWDON & CLIVER, 1996). No entanto, a

contaminação secundária deste alimento deve ser evitada, sendo com isso essencial o manejo adequado do apiário e ou meliponário, com emprego de BPFs.

Ragazani *et al.* (2008) observaram que 7% (de 100 amostras de mel de *A. mellifera* comercializadas por ambulantes, mercados e feiras livres, de seis Estados brasileiros São Paulo, Santa Catarina, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Ceará) estavam contaminadas com *C. botulinum*, e de acordo com a Portaria 5/2006, da Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, suspeitas de casos exigem notificação à vigilância epidemiológica local e investigação imediata.

A importância do *C. botulinum* deve-se à capacidade destes de produzir esporos resistentes, existindo relatos de sua sobrevivência por mais 30 anos em um meio fluido. Essa espécie é caracterizada por bastonetes Gram positivos, anaeróbios estritos, móveis, com flagelos peritríqueos, sendo destruídos a 121° C por 15 minutos, enquanto suas toxinas são destruídas a 100°C por 20 minutos. O pH ideal para o *C. botulinum* varia de neutro a alcalino, temperatura entre 30 e 37°C, porém há registros da sobrevivência de esporos dessa bactéria à temperatura de 4°C (JAY, 2005; NEVAS, 2006; CERESER *et al.*, 2008).

O botulismo infantil, também conhecido como botulismo de lactentes (associado à Síndrome de Morte Súbita do Recém-Nascido), ocorre em crianças muito jovens devido à absorção de toxina produzida *in vivo*, no intestino da criança. A ausência da microbiota de proteção permite a germinação de esporos de *Clostridium botulinum* ingeridos e a produção de toxina na luz intestinal (CERESER, *et al.*, 2008; RAGAZANI *et al.*, 2008).

5.5 – Atividade Antibacteriana

As diferentes amostras de méis de abelhas nativas, em geral, apresentaram maior atividade antimicrobiana frente a *S. Typhimurium* e *E. coli* (Figura 38, Tabelas 9 e 10) do que méis de abelhas africanizadas. Em relação a *H. pylori* esta diferença não foi observada.

O maior halo de inibição frente a *S. Typhimurium* foi observado para solução de mel a 25% do mel de *M. scutellaris* AU8 ($39,95 \pm 3,04$). No entanto, em relação a *E. coli*, os méis de abelhas nativas apresentaram atividade antimicrobiana superior aos de *A. mellifera*, no qual apenas as amostras M8, M13 e M14 apresentaram atividade. O maior halo de inibição contra essa enterobactéria foi observado para o mel de Jandaíra (*M. subnitida*) AJ1 ($35,5 \pm 3,04$), solução a 25% (Tabelas 9 e 10).

TABELA 9 – Halo de inibição (Média de Diâmetro $\pm$ DP) de soluções aquosas de méis de *Apis mellifera* (M1-M14), colhidos na estação seca de 2008/09, no Estado de Alagoas, frente a microrganismos incubados por 24 h a 30 ± 1 °C (*Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*) ou a 37 °C (*H. pylori*) em meio AN.

AMOSTRAS		Halo de inibição (Diâmetro em mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>H. pylori</i>
M1	25%	-	-	-
	15%	-	-	-
M2	25%	-	-	-
	15%	-	-	-
M3	25%	-	-	-
	15%	-	-	-
M4	25%	-	-	-
	15%	-	-	-
M5	25%	-	-	-
	15%	-	-	-
M6	25%	-	-	45,80 $\pm$ 0,70
	15%	-	-	39,45 $\pm$ 2,19
M7	25%	-	-	-
	15%	-	-	-
M8	25%	23,50 $\pm$ 0,70	29,75 $\pm$ 0,38	42,50 $\pm$ 0,70
	15%	19,00 $\pm$ 0,00	23,20 $\pm$ 0,28	38,55 $\pm$ 0,63
M9	25%	-	34,50 $\pm$ 0,70	45,55 $\pm$ 0,63
	15%	-	24,50 $\pm$ 0,70	42,00 $\pm$ 1,41
M10	25%	-	26,00 $\pm$ 0,00	-
	15%	-	-	-
M11	25%	-	-	-
	15%	-	-	-
M12	25%	-	34,00 $\pm$ 0,00	-
	15%	-	18,70 $\pm$ 0,70	-
M13	25%	26,00 $\pm$ 0,00	27,00 $\pm$ 0,00	31,50 $\pm$ 0,70
	15%	18,00 $\pm$ 0,70	-	27,90 $\pm$ 1,55
M14	25%	29,50 $\pm$ 0,70	30,50 $\pm$ 0,70	-
	15%	20,00 $\pm$ 1,41	21,00 $\pm$ 4,24	-
Vancomicina (30 μ g)		15,50 $\pm$ 3,52	11,36 $\pm$ 0,79	30,42 $\pm$ 1,11
Norfloxacin (10 μ g)		42,56 $\pm$ 1,47	41,16 $\pm$ 0,79	30,57 $\pm$ 1,58
Ampicilina (10 μ g)		14,54 $\pm$ 1,98	24,90 $\pm$ 3,11	37,32 $\pm$ 1,54
Cotrimoxazol (25 μ g)		51,25 $\pm$ 1,20	35,10 $\pm$ 0,00	48,50 $\pm$ 3,53
Ofloxacin (10 μ g)		24,00 $\pm$ 0,14	40,6 $\pm$ 2,12	39,05 $\pm$ 3,04

TABELA 10- Halo de inibição (Média de Diâmetro $\pm$ DP) de soluções aquosas de méis de *Melipona scutellaris* (AU1-AU22), *M. quadrifasciata* (AM1-AM3), *M. subnitida* (AJ1-AJ2) e *Plebeia* sp. (AP1-AP2), colhidos na estação seca de 2008/09, no Estado de Alagoas, frente a microrganismos incubados por 24 h a 30 ± 1 °C (*Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium) ou a 37 °C (*H. pylori*) em meio AN.

AMOSTRAS		Halo de inibição (Diâmetro em mm)			AMOSTRAS		Halo de inibição (Diâmetro em mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>H. pylori</i>			<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>H. pylori</i>
AU1	25%	32,46 $\pm$ 1,08	31,94 $\pm$ 1,20	-	AU17	25%	-	-	34,4 $\pm$ 0,56
	15%	26,60 $\pm$ 0,62	25,26 $\pm$ 1,62	-		15%	-	-	-
AU2	25%	28,40 $\pm$ 0,61	29,20 $\pm$ 1,30	-	AU18	25%	-	-	-
	15%	-	-	-		15%	-	-	-
AU3	25%	28,66 $\pm$ 0,58	22,32 $\pm$ 0,38	-	AU19	25%	25,25 $\pm$ 3,18	29,53 $\pm$ 2,23	-
	15%	22,06 $\pm$ 1,10	17,92 $\pm$ 0,55	-		15%	30,25 $\pm$ 1,06	25,02 $\pm$ 2,12	-
AU4	25%	28,60 $\pm$ 4,00	34,00 $\pm$ 1,41	-	AU20	25%	-	-	-
	15%	-	-	-		15%	-	-	-
AU5	25%	18,55 $\pm$ 2,05	28,16 $\pm$ 4,47	-	AU21	25%	23,50 $\pm$ 0,50	30,00 $\pm$ 1,00	43,60 $\pm$ 0,70
	15%	-	20,30 $\pm$ 1,60	-		15%	-	28,00 $\pm$ 1,00	37,55 $\pm$ 0,63
AU6	25%	25,3 $\pm$ 0,34	27,10 $\pm$ 2,82	-	AU22	25%	-	29,50 $\pm$ 1,50	-
	15%	17,66 $\pm$ 1,15	17,55 $\pm$ 4,87	-		15%	-	27,50 $\pm$ 0,50	-
AU7	25%	32,23 $\pm$ 3,10	21,50 $\pm$ 0,70	-	AM1	25%	28,33 $\pm$ 3,51	32,45 $\pm$ 0,77	-
	15%	20,66 $\pm$ 0,55	14,90 $\pm$ 0,14	-		15%	-	25,10 $\pm$ 2,12	-
AU8	25%	-	39,95 $\pm$ 3,04	-	AM2	25%	23,50 $\pm$ 0,70	35,80 $\pm$ 0,28	-
	15%	-	28,60 $\pm$ 4,94	-		15%	-	-	-
AU9	25%	33,70 $\pm$ 1,50	29,60 $\pm$ 5,93	-	AM3	25%	-	33,50 $\pm$ 0,70	-
	15%	26,43 $\pm$ 0,90	20,00 $\pm$ 0,00	-		15%	-	26,75 $\pm$ 1,06	-
AU10	25%	26,03 $\pm$ 1,05	34,56 $\pm$ 1,96	-	AJ1	25%	35,50 $\pm$ 3,04	32,40 $\pm$ 1,21	-
	15%	12,63 $\pm$ 0,72	25,13 $\pm$ 1,41	-		15%	25,66 $\pm$ 0,57	26,60 $\pm$ 0,52	-
AU11	25%	-	31,50 $\pm$ 1,50	42,55 $\pm$ 0,63	AJ2	25%	-	31,00 $\pm$ 1,41	-
	15%	-	25,66 $\pm$ 0,57	36,0 $\pm$ 0,0		15%	-	18,00 $\pm$ 0,70	-
AU12	25%	23,90 $\pm$ 1,27	27,60 $\pm$ 0,53	43,0 $\pm$ 1,4	AP1	25%	32,00 $\pm$ 1,00	32,66 $\pm$ 0,57	-
	15%	19,40 $\pm$ 0,40	21,66 $\pm$ 0,57	35,55 $\pm$ 0,63		15%	25,80 $\pm$ 0,40	25,66 $\pm$ 0,57	-
AU13	25%	-	33,70 $\pm$ 1,66	-	AP2	25%	-	-	30,75 $\pm$ 1,06
	15%	-	26,33 $\pm$ 0,57	-		15%	-	-	21,00 $\pm$ 0,00
AU14	25%	-	-	-	Vancomicina (30 μ g)		15,50 $\pm$ 3,52	11,36 $\pm$ 0,79	30,42 $\pm$ 1,11
	15%	-	-	-	Norfloxacinina (10 μ g)		42,56 $\pm$ 1,47	41,16 $\pm$ 0,79	30,57 $\pm$ 1,58
AU15	25%	-	-	-	Ampicilina (10 μ g)		14,54 $\pm$ 1,98	24,90 $\pm$ 3,11	37,32 $\pm$ 1,54
	15%	-	-	-	Cotrimoxazol (25 μ g)		51,25 $\pm$ 1,20	35,10 $\pm$ 0,00	48,50 $\pm$ 3,53
AU16	25%	-	20,66 $\pm$ 0,57	-	Ofloxacinina (10 μ g)		24,00 $\pm$ 0,14	40,60 $\pm$ 2,12	39,05 $\pm$ 3,04
	15%	-	-	-					

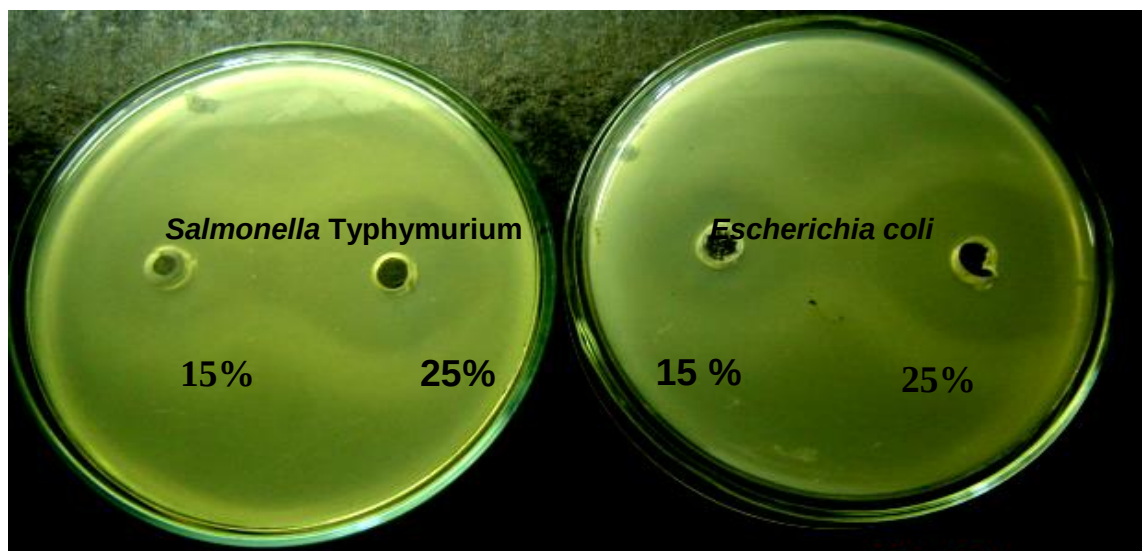


FIGURA 38 – Halo de inibição de crescimento de *S. Typhimurium* e *E. coli* de soluções aquosas de mel (15 e 25%) de *Plebeia* sp coletado em Delmiro Gouveia – AL na estação das secas 2008/09.

No tocante a *H. pylori*, microrganismo comumente associado a patologias gástricas, observou-se que apenas as amostras de méis de nativas AU11, AU12, AU17, AU21 e AP2 apresentaram ação antimicrobiana, no entanto, em relação aos méis de *A. mellifera* apenas as amostras M6, M8, M9 e M13 também apresentaram atividade antimicrobiana contra esse patógeno. O maior halo de inibição foi observado para o mel de *A. mellifera* M6 ($45,8 \pm 0,7$), sendo esse inclusive superior ao do antibiótico Norfloxaxina ($30,57 \pm 1,58$), e semelhante ao do antibiótico mais indicado no tratamento contra essa bactéria, o Cotrimoxazol ($48,5 \pm 3,53$).

Apenas as amostras AU12 e AU21 de *M. scutellaris* apresentaram ação antibacteriana contra os três microrganismos testados. No entanto, em relação aos méis de *A. mellifera* as amostras M8 e M13 apresentaram ação antimicrobiana contra as três bactérias.

Observou-se ainda que os 5 antibióticos utilizados como controles positivo apresentaram ação antimicrobiana, destacando-se o cotrimoxazol, uma sulfonamida que inibe a incorporação do PABA (ácido para-aminobenzóico) na síntese de ácido dihidrofólico (necessário para síntese das purinas), atuando na síntese de DNA (amplo espectro) (TRABULSI & ALTHERTUM, 2004). Apesar da vancomicina ser indicada para bactérias Gram positivas, é um glicopeptídeo que inibe a síntese da parede celular bacteriana, bloqueando a incorporação das subunidades N-ácido acetilmuramico e N-

acetilglucosamina no peptideoglicano, e apresentou atividade contra as cepas Gram negativas testadas, ainda que menor (TRABULSI & ALTHERTUM, 2004).

Demera & Angert (2004) compararam a atividade antimicrobiana do mel produzido por *A. mellifera* e *Tetragonisca angustula* na Costa Rica contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e duas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Cândida albicans*, e constaram que não houve diferença estatística entre os méis quanto à ação testada. Resultados semelhantes foram observados por Miorin *et al.* (2003), os quais avaliaram a atividade antimicrobiana de mel de *A. mellifera* e *T. angustula* produzidos nos Estados do Paraná e Minas Gerais frente a *S. aureus*. A concentração inibitória mínima (CIM) variou de 126,23 a 185,70 mg . mL¹ para o mel de *A. mellifera*, enquanto em relação ao mel de *T. angustula* a variação foi de 142,87 a 214,33 mg. mL¹.

Macedo (2007), por sua vez, avaliou a atividade antimicrobiana de soluções aquosas de 15% e 25% de mel de abelhas africanizadas e de *M. quadrifasciata* (mandaçaia), também através da metodologia de difusão em ágar, evidenciando que o mel de abelha sem ferrão apresentou atividade antimicrobiana superior ao de abelhas africanizadas, e atribui isso principalmente ao efeito osmótico, já que o controle negativo (solução de glicose com concentração glicídica equivalente) apresentou resultado semelhante.

Muitos compostos antimicrobianos têm sido identificados a partir de méis de diferentes origens florais, como é o caso de mel de manuka (*L. scoparium*), espécie vegetal nativa da Nova Zelândia. Este teve sua forte atividade antibacteriana desassociada da concentração do peróxido de hidrogênio produzido pela ação da glicose-oxidase sobre glicose, quando em estudos de WESTON *et al.* (2000), utilizou-se a enzima catalase em associação com o mel nos ensaios antimicrobianos. Tal enzima converte H₂O₂ em água e O₂, mas as amostras continuaram apresentando forte atividade antimicrobiana. Segundo Russel (1983), citado por Al-Mamary *et al.*, (2002), os compostos com atividade antimicrobiana isolados nesses méis de manuka são o metil 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoato e metil 3,4,5-trimetoxibenzoato. Weston *et al.* (1999) também identificaram os flavonóides pinobanksina, pinocembrina, chrisina e galangina em mel dessa planta, atribuindo a eles, independentemente de serem originários de néctar, pólen e própolis, a responsabilidade parcial nessa ação.

Thuchado *et al.* (2009) avaliando a atividade antibacteriana do mel de *A. mellifera* de diferentes origens florais e geográficas frente à *Cromobacterium violaceum* (bactéria

Gram negativa) observaram que méis de mesma origem floral, embora de diferentes locais, apresentaram atividade antibacteriana semelhante. Os méis de castanheira foram os que apresentaram maior atividade antimicrobiana, por outro lado os méis de laranjeira foram aqueles com menor ação contra bactérias, evidenciando a influência da origem floral, independentemente da origem geográfica para essa função.

Estudos recentes têm relacionado à atividade antimicrobiana do mel a diferentes flavonóides (incluindo flavonas, flavonóis e flavanonas) e outros compostos fenólicos (principalmente ácido cinâmico e seus ésteres) (KUÇUK *et al.*, 2007; THUCHADO *et al.*, 2009). No entanto, no presente estudo não foi observada relação direta entre o conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides totais e a atividade antibacteriana dos diferentes méis. Portanto, a ação antibacteriana de algumas das amostras de mel, especialmente de abelhas nativas de Alagoas, coletado na estação seca de 2008/09, provavelmente se deva ao efeito sinérgico do alto conteúdo de íons H^+ , glicídios e compostos fenólicos que se ligam às unidades glicídicas formadoras de sua parede celular, inviabilizando sua proliferação.

5.6 – Atividade Antifúngica

Soluções aquosas de mel (50%) de abelhas nativas e africanizadas foram testadas frente aos fungos filamentosos *Byssoclomys fulva*, *Talaromyces flavus* e *Neosartorya fischeri*, os quais são termorresistentes e comumente isolados em fluxogramas de produção de polpa e sucos de frutas industrializados e submetidos à pasteurização (SALOMÃO *et al.*, 2008). Vários trabalhos têm relatado a ocorrência desses fungos em alimentos (HOFFMANN, 2004; LEAL, 2007; SALOMÃO *et al.*, 2008), sendo um dos grandes problemas na indústria alimentícia processadora de alimentos vegetais, no entanto, a produção da micotoxina 4-hidroxi-4H-furo [3,2-c] pirano-2 (6H) patulina, *Byssoclomys* é um fator de mais de interesse na área da saúde.

O crescimento médio (Figura 39) desses fungos obtido em ágar Sabouraud sem adição de mel e incubado a $25 \pm 1^\circ C$, ao abrigo da luz, durante 7 dias foi de 69 mm para *N. fischeri*, 55 mm para *T. flavus* e 90 mm para *B. fulva*.

Independente da origem entomológica, em geral, os méis estudados não apresentaram atividade contra os três fungos termorresistentes testados, destacando-se apenas as amostras de mel AU7, AU10 e M4, as quais reduziram ligeiramente o crescimento de *N. fischeri*, AU6, AU7, AJ2, AP2 e M1, as quais reduziram ligeiramente o crescimento de *T. flavus*, e AU1, AU11, AJ1, AP1 e AP2, as quais reduziram ligeiramente o crescimento de *B. fulva* (Figura 40). As maiores inibições do crescimento foram

proporcionadas pelas amostras AJ2 e AP2 contra *T. flavus* (30,3-31%). Apenas as amostras AU7, AP2 e M1 reduziram o crescimento de mais de um fungo (Tabela 11).

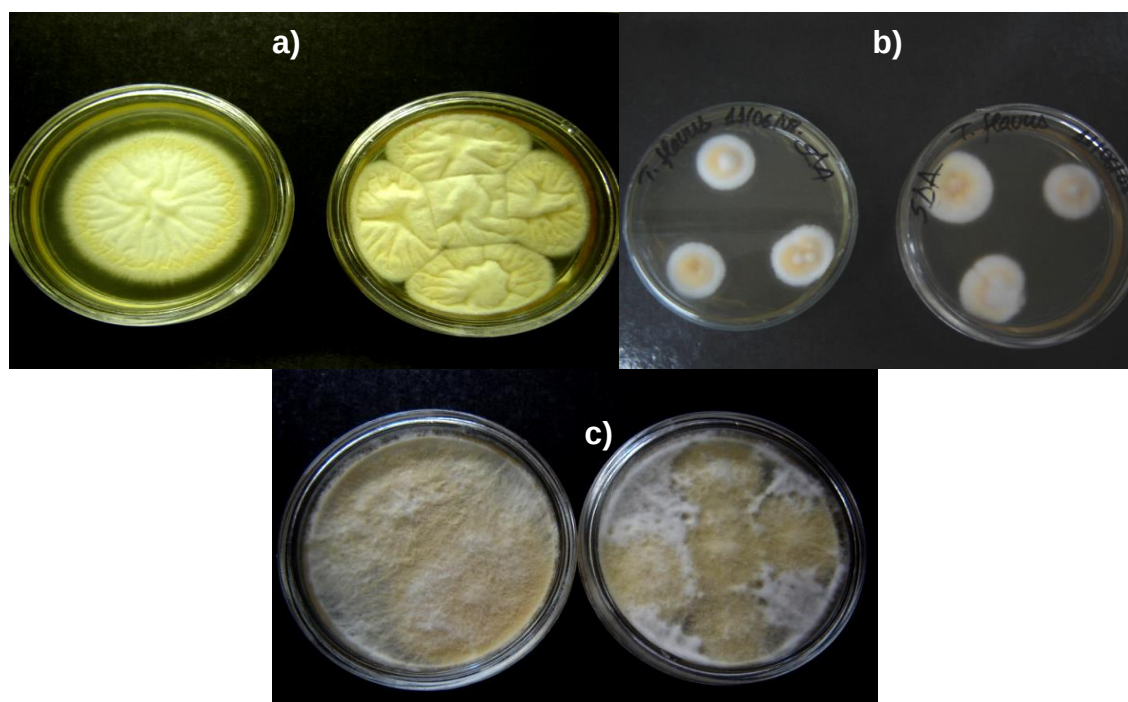


FIGURA 39 – Aspecto do crescimento de *Neosartorya fischeri* (a), *Talaromyces flavus* (b) e *Bysshoclamys fulva* (c), incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, ao abrigo da luz, durante 7 dias.



FIGURA 40 – Inibição de *B. fulva* frente à solução aquosa de mel de *M. scutellaris* 50% A) Controle negativo, B) Inibição do *B. fulva* e diminuição do volume de micélio e aspecto de esporulação.

TABELA 11 – Inibição de crescimento (%) dos fungos *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces flavus* e *Byssoclamys fulva* frente à solução aquosa de mel (50%) de abelhas *A. mellifera*, *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp, coletadas na estação seca (2008/09) do Estado de Alagoas.

AMOSTRAS	<i>Neosartoty fischeri</i>	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Byssoclamys fulva</i>
	Inibição do crescimento micelial (%)		
AU1	-	-	17,66
AU2	-	-	-
AU3	-	-	-
AU4	-	-	-
AU5	1,12	3,94	-
AU6	-	17,32	-
AU7	14,13	16,71	-
AU8	-	-	-
AU9	-	18,52	-
AU10	19,83	-	-
AU11	-	-	15,90
AU12	-	-	-
AU13	-	-	-
AU14	-	-	-
AU15	-	-	-
AU16	-	-	-
AU17	-	-	-
AU18	-	-	-
AU19	-	-	-
AU20	-	8,80	-
AU21	-	-	-
AU22	-	-	-
AM1	-	-	-
AM2	-	-	-
AM3	-	-	-
AJ1	-	-	16,66
AJ2	-	31,00	-
AP1	-	-	16,66
AP2	-	30,30	15,90
M1	10,05	15,00	-
M2	-	5,36	-
M3	8,00	1,81	-
M4	20,26	-	-
M5	-	-	-
M6	12,69	-	-
M7	11,9	-	-
M8	-	-	-
M9	-	-	-
M10	-	-	-
M11	-	-	-
M12	-	-	-
M13	-	-	-
M14	-	-	-

- Não houve inibição de crescimento.

Al-Mughrab (2003), avaliando a atividade antifúngica de mel contra fungos fitopatogênicos, observou que *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Stemphylium solani* e *Colletotrichum* sp foram sensíveis a uma solução aquosa contendo 1 mg de mel. mL⁻¹. A concentração testada foi eficaz na redução do crescimento micelial de *A. solani* (42 ± 4,3 %) e de *P. infestans* (38,2 ± 3,3 %). No entanto, as espécies *S. solani* e *Colletotrichum* sp foram menos sensíveis a essa solução. No caso dos fungos aqui utilizados, sua própria forma de reprodução (ascocarpos, produzindo ascos com ascósporos) os habilita a resistirem aos agentes que em geral atacam outros microrganismos.

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, foi possível concluir que:

- 1) Mesmo os méis de diferentes espécies de abelhas, de uma mesma região e estação do ano, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação à sua composição química, exceto no que diz respeito à condutividade elétrica e sacarose. Isso revela a importância de se adequar à legislação atual conforme a origem entomológica do mel.
- 2) Observou-se que o conteúdo de fenóis e flavonóides totais, principais antioxidantes encontrado em mel, variou estatisticamente segundo a variável entomológica, sendo os méis de *Plebeia* sp e *A. mellifera* aqueles com maior teor destes compostos.
- 3) No que se refere às substâncias antioxidantes, os méis de abelhas africanizadas (*A. mellifera*) apresentaram maior conteúdo dessas substâncias do que as abelhas nativas, com exceção de méis da espécie *Plebeia* sp, que inclusive se mostraram superiores nesse e em outros aspectos aos méis das demais abelhas nativas.
- 4) No tocante a segurança microbiológica do mel produzido nas diferentes regiões do Estado, durante a estação seca de 2008/09, apenas duas amostras de mel de *M. scutellaris* apresentaram esporos de *Clostridium* sp, provavelmente veiculados pela própria abelha, pois as mesmas foram colhidas segundo todos os critérios de boas práticas de higiene.
- 5) Em relação à atividade antimicrobiana, verificou-se que em concentrações de até 25%, os méis de abelhas nativas apresentaram maior atividade em relação aos méis de *A. mellifera*, principalmente em relação às enterobactérias *S. Typhimurium* e *E. coli*.
- 6) Independente da origem entomológica, em geral, os méis estudados não

apresentaram atividade contra os fungos termorresistentes *N. fisheri*, *T. flavus* e *B. fulva*. Destacaram-se apenas as amostras de mel de abelhas nativas AU7 e AP2 e M1 de *A. mellifera* as quais reduziram ligeiramente o crescimento de mais de um fungo.

- 7) Portanto, a ação antibacteriana de algumas amostras de mel, especialmente de nativas, do Estado de Alagoas, coletado na estação seca de 2008/09, provavelmente se deve ao efeito sinérgico da alta concentração de íons H^+ (baixo pH), glicídios (potencial osmótico) e compostos fenólicos que se ligam às unidades glicídicas formadoras de sua parede celular, inviabilizando sua adequada proliferação. A resistência fúngica às altas concentrações glicídicas e baixo pH, aliada à constituição diferenciada da parede celular micelial (quitina e celulose) e envolvendo seus esporos (glicoproteínas), provavelmente expliquem a baixa atividade das soluções de mel contra o desenvolvimento dos mesmos.

7. PERSPECTIVAS E SUGESTÕES DE ESTUDOS

O presente trabalho é parte de um projeto global que visa avaliar a qualidade físico-química e microbiológica de mel e pólen de diferentes mesorregiões do Estado de Alagoas, nas estações de seca e chuvas, por mais de um ano. Nesse sentido, como perspectivas espera-se que seja possível dar continuidade ao trabalho nos mesmos apiários durante a estação de chuvas de 2009, além de estendê-lo para mais mesorregiões. Além disso, a avaliação da origem palinológica e da qualidade físico-química e microbiológica desse pólen das colméias também deverá ter continuidade, não só pelo interesse do setor apícola de Alagoas como um todo nessas informações, que serão cadastradas num sistema de dados georreferenciado para melhorar a logística de produção, manejo e comercialização, mas também do governo federal. Este tem como meta incentivar o desenvolvimento sustentável, apoiando atividades como a apicultura e a meliponicultura, e também legislar e fiscalizar a qualidade sanitária dos alimentos e nutracêuticos em geral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACQUARONE, C.; BUERA, P.; ELIZALDE, B. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, v. 101, p. 695–703, 2007.

ADELMANN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Curitiba, 186 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal do Paraná, PR, 2005.

AIDAR, D.S. A mandaçaia – Biologia e Manejo de *Melipona quadrifasciata*. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 104 p., 1996.

ALCOFORADO-FILHO, F.G. Sustentabilidade do Semi-árido através da apicultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12., Salvador, 1998. p. 61. Anais... Salvador: Confederação Brasileira de Apicultura, 1998.

AL, M. L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, A.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, v.112, p.863-867, 2009.

ALLEN, K. L.; MOLAN, P. C.; REID, G. M. The variability of the antibacterial activity of honey. *Apiacta*, v. 26, p.114–121, 1991.

ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, v.85, p.513-518, 2004.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, v.22, p.1041–1047, 2002.

ALMEIDA, D. DE. Espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em áreas de Cerrado no município de Pirassununga, Estado de São Paulo. Dissertação, 103p. (Mestrado em Entomologia), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

ALMEIDA-ANACLETO, D. Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo. São Paulo, 133p. Tese (Doutorado em Entomologia), Universidade de São Paulo, SP, 2007.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. ; MATSUDA, A. H. ; BASTOS, D. H. M. . Physico-chemical parameters of *Melipona Amazon* honey. Química Nova, v. 30, p. 707-708, 2007.

AL-MUGHRAHI, K. I. Wild honey inhibits growth of some phytopathogenic fungi in vitro. Phytopathology Mediterranean, v. 42, p. 280-283, 2003.

ALNAQDY, A.; AL-JNABRI, A.; NZEAKO, B.; NSANZE, H. Inhibition effect of honey on the adherence of *Salmonella* to intestinal epithelial cells *in vitro*. International Journal of Food Microbiology, v.103, p.347-351, 2005.

ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona Mandaçaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.25, p. 644-650, 2005.

ALVES, A. M. Identificação da flora e caracterização do mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas floresta e laranjeira, do alto rio Paraná. Maringá, 66p. Tese (Doutorado em Zootecnia- Universidade Estadual de Maringá), PR, 2008

AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. Apidologie, v.20, p. 115-125, 1989.

ANGELO, P. M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.66, p.1-9, 2007.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. Food Chemistry, v. 63, p.549-562, 1998.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Washington, 1170p. 1997

ARAÚJO, J. M. A. Química de Alimentos: Teoria e Prática. 4. ed. Viçosa-MG: Editora UFV, v. 1. 596 p., 2008.

ARRUDA, C. M. F.; MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S.; MORETI, A. C. C. C. Características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera*, 1758 (Hymenoptera, Apidae), da região da chapada do Araripe, Município de Santana do Cariri, Estado do Ceará. Boletim da Indústria Animal, N. Odessa, v.61, n.2, p.141-150, 2004.

AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. DA C.; DAMASCENO, J. G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 19, n. 1, p. 3-7, 1999.

BALTRUSAITYTE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; CEKSTERYTE, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. Food Chemistry, v.101, p.502–514, 2007.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARROS, G. C., MENDES, E. S., SILVA, L. B. G., OLIVEIRA, L.A. Qualidade físico-química e microbiológica de méis comercializados na grande Recife, PE. Revista de Higiene Alimentar, v.17, n.112, p. 53-58, 2002.

BARTH, O. M. O pólen no mel brasileiro. Rio de Janeiro: Luxor, 226p, 1989.

BARTH, O. M. Análise polínica de mel: avaliação de dados e seu significado. Mensagem Doce, São Paulo, v.81, p.2-6, 2005.

BARTH, O. M.; MAIORINO, C.; BENATTI, A.P. T.; BASTOS, D. H. M. Determinação de parâmetros físico-químicos e da origem botânica de méis indicados monoflorais do Sudeste do Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 25, p. 229-233, 2005.

BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Acta Analytica Chimica, v.533, p.185–191, 2005.

BERTOLDI, F. C.; GONZAGA, L.; REIS, V. D. A. Características físico-químicas do mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), com florada predominante de hortelã-do-campo (*Hyptis crenata*), produzido no Pantanal. In: IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio econômico do Pantanal. Resumo Corumbá – MS, 2004.

BERTONCELJ, J.; DOBERSEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chemistry, v.105, p. 822-828, 2007.

BIANCHI, E. M. La miel, características e composición – Análisis e aduteraciones. Santiago Del Estero: Unse, CEDIA, 1989.

BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. Food Chemistry, v. 97. p. 217-222, 2005.

BOGDANOV, S. Harmonised methods of the international Honey commission. International Honey Commission, 62p. 2002.

BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L. P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. Apidologie, v.35, p.4-17, 2004.

BOGDANOV, S. Antibacterial substances in honey. Swiss Bee Research Centre, p.01-10, 1997.

BORSATO, D. M. Avaliação de méis com indicação monofloral, comercializados na Região dos Campos Gerais – Ponta Grossa, 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Ponta Grossa), PR, 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de mel. Instrução Normativa nº 11, 20 de outubro de 2000.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology, v.28, p.25-30. 1995.

BURATTI, S.; BENEDETTI, S.; COSIO, M. S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta*, 2006.

C.A.C. (Codex Alimentarius Comission), Vol. III, supl. 2, 1990.

CÂMARA, J. Q.; SOUZA, A. H. DE.; VASCONCELOS, W. E. DE.; FREITAS, R. S.; MAIA, P. H. S.; ALMEIDA, J. C. DE.; MARACAJÁ, P. B. Estudos de meliponíneos, com ênfase na *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. *Revista de Ciência & Biologia da Terra*, v.4, n.1, 2004.

CAMPOS, M.G.R. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. *Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra, Coimbra*, v.11, n.2, p.17-47, 1987.

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

CARPES, S. T., BEGNINI, R., ALENCAR, S. M., MASSON, M. L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidante and bacterial activity. *Ciência Agrotécnica, Lavras*, v. 31, n. 6, p. 1818-1825, 2007.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2. ed. Campinas, SP: Ed. da Unicamp, 207p. , 2003.

CERESER, N. D.; COSTA, F. M. R.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; SILVA, D. A. R.; SPEROTTO, V. R. Botulismo de Origem Alimentar. *Ciência Rural*, v. 38, p. 280-287, 2008.

CHENG, Z.; REN, J.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. *Bioorganic Chemistry*, v.31, n.2, p.149-162, 2003

COOPER, R. Honey in wound care: antibacterial properties. *Krankenhaushygiene Interdisziplinär*, v. 2, 2007.

CORTOPASSI-LAURINO, M. ; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. ; ROUBIK, D.W ; DOLLIN, A ; HEARD, T. ; VENTURIERI, G.C ; EARDLEY, C. ; NOGUEIRA-NETO, P. Global Meliponiculture: challenges and opportunities.

Apidologie, v. 37, p. 275-292, 2006.

COTTE, J. F.; CASABIANCA, H.; GIROUD, B.; ALBERT, M.; LHERITIER, J.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, v. 378, p.1342–1350, 2004.

CRANE, E. O livro do mel. São Paulo: Nobel, 226p. 1983.

CUSHNIE T, LAMB A: Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 20, p.343-356, 2005.

D'ARCY, B. R. Antioxidants in Australian Floral Honeys - Identification of health-enhancing nutrient components. *Rural Industries Research*, 84 p., 2005. Disponível em: <http://www.rirdc.gov.au>. Acesso em 18 de outubro de 2008.

D'ARCY, B. R.; HAWES, G. Chemical food analysis a practical manual. An University of Queensland Publication, 167 p., 2006.

DEMERA, J. H.; ANGERT, E. R. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. *Apidol.*, v. 35, p. 411–417, 2004.

DINKOV, D. A scientific note on the specific optical rotation of three honey types from Bulgária. *Nota Científica. Apidologie*, v.34, p.319–320, 2003.

EMBRAPA. Produção de mel e comercialização. Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br>. Acesso em: 15 de dez. de 2008.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M.S.; BESERRZ, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, p.1166-1171, 2005.

FERREIRA, I. C. F. R.; AIRES, E. BARREIRA, J. C. M.; ESTEVINHO, L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, v.114, p.1438–1443, 2009.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*,

v.100, p.1649 –1653. 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Ed. Atheneu, 182 p, 2003.

FRANCHINI, R. A. A. E.; MATOS, R.C. Análise dos níveis de peróxido de hidrogênio em amostras de mel usando a enzima peroxidase imobilizada em reator tubular, In: Congresso Brasileiro de Química, 46, 2006, Anais... Salvador, Ba, 2006.

FREITAS, B. M. Meliponíneos. Parte do material extraído do CD-ROM – A Vida das Abelhas. Fortaleza. UFC, 2003.

FRENCH, V. M.; COOPER, R. A.; MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative *Staphylococcus*. Journal of Antimicrobials & Chemotherapy Drugs, v.56, p.228–231, 2005.

GUERRINI, A.; BRUNI, R.; MAIETTI, S.; POLI, F.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; SCALVENZI, L. ; SACCHETTI, G. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. Food Chemistry, v. 14, p. 1413–1420, 2009.

GHELDOLF, N.; WANG, X.; ENGESETH, N. J. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. Journal of Agriculture & Food Chemistry, v.50, p.5870-5877, 2006.

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

GONÇALVES, A. L.; FILHO ALVES A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (HYMENOPTERA: APIDAE, MELIPONINI). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, 2005.

HENRIQUES, A. Mel: um milagre da natureza para o tratamento de feridas? Revisão, 2004. Disponível em www.forma-te.com/mediateca/download-document/5202-utilizacao_do_mel_nas_feridas.html. Acesso em 16 de setembro de 2008.

HOFFMANN, M. S. Estudo da Resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã. Santa Catarina, 75p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2004.

HUIDOBRO, J. F., SANTANA, F. J., SANCHES, M. P., SANCHO, M. T., MUNIATEGUI, S.; SIMAL-LOZANO, J. Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *Journal of Apiculture Research*, v. 34, n.1, p. 39-44, 1995.

ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Microorganismos de los Alimentos*. España: Ed. Acribia. Espanha. Traduzido por MORENO, B. G. 1982.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4.ed. v.1. São Paulo: O Instituto Adolfo Lutz, 2005.

IURLINA, M. O.; FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, v.105, p.297-304, 2005.

IURLINA, M.O.; SAIZ, A. I.; FUSELLI, S. R.; FRITZ, R. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, v. 39, p.105–110, 2006.

IURLINA, M.O.; SAIZ, A. I.; FRITZ, R.; MANRIQUE, G. D. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. *Food Chemistry*, v.115, p. 1141–1149, 2009.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6.ed..São Paulo: Artemed, 2005.

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

KÜÇÜK, M.; KOLAYH, S.; KARAOGLU, S.; ULUSOY, E.; BALTACI, C.; CANDAN. F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, v.100, p. 526 –534, 2007.

KÜPLÜLU, Ö.; GÖNCÜOĞLU, M.; ÖZDEMİR, H.; KOLUMAN, A. Incidence of

Clostridium botulinum spores in honey in Turkey. Food Control, v. 17, p. 222 –224, 2006.

LACHMAN, J.; KOLIHOVÁ, D.; MIHOLOVÁ, D.; KOSATA, J.; TITERA, D.; KULT, K. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. Food Chemistry, v. 101, p. 973–979, 2007.

LEAL, P. A. Modelagem preditiva do crescimento de *Neosartorya fischeri* e *Byssoschlamys nivea* em suco de frutas. Florianópolis, 232p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. Food Chemistry, v.100, p. 237-240, 2007.

LEGLER, S. Os produtos das abelhas e seus efeitos na saúde humana. CBA – artigos técnicos, 16p. 2007.

LEGLER, S. Criação racional de abelhas (apostila). Departamento de Zootecnia, Setor de Apicultura, UFSM, 79 p., 1994.

LIANG, Y.; CAO, W.; CHEN, W.; XIAO, X.; ZHENG, J. Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection. Food Chemistry, v. 114, p. 1537–1541, 2009.

LIANDA, R. L. P. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica. Rio de Janeiro, 142p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2004.

LIANDA, R. L. P. Perfil de Substâncias Fenólicas de Méis Brasileiros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2009.

LIMA, A. O. N. Pólen coletado por abelhas africanizadas em apiário comercial na Caatinga Cearense. Fortaleza, 118p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Ceará, CE, 1995.

LIN, M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M.T.; PAI, Y.S. *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus sucedanea* and *Garcinia multiflora*. Journal of Natural Products, v. 60, p. 884-888. 1997.

LOCATELLI, J. C.; MEDEIROS, L.; SANTANA, W. C. Censo 2005 sobre a meliponicultura no Brasil. In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura e II Congresso Brasileiro de Meliponicultura, 2006, Aracaju. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Apicultura e II Congresso Brasileiro de Meliponicultura, 2006.

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. Agricultura, v. 2, p. 7-9, 2005.

LOWRY, O H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A L., RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265-275. 1951.

LUSBY, P. E., COOMBES, A.L., & WILKINSON, J.M. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. Archives of Medical Research, v.36 464-467, 2005.

MACEDO, L. N. Propriedades Prebióticas e Antimicrobianas de Mel de Abelhas. Soropédica. Rio de Janeiro, 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), RJ , 2007.

MARCHINI, L.C.; SOUZA, B. de A. Composição físico-química, qualidade e diversidade dos méis brasileiros de abelhas africanizadas. . In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura, Aracajú, 2006. CD ROOM, Resumo. Aracajú, Confederação Brasileira de Apicultura, 2006.

MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; TEXEIRA, G. M.; OLIVEIRA, P. C. F.; RUBIA, V. R. Características físico-químicas de amostras de méis da abelha urucu (*Melipona scutellaris*). In: XII Congresso Brasileiro de Apicultura, BA, p. 201, 1998.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Química Nova, v. 19, p. 529-536, 1996.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J. NACOUUMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina

Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, v.91, p.571–577, 2005.

MENDES, E.; PROENÇA, E. B.; FERREIRA, .M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate Polymers*, v.37, p.219–223, 1998.

MENDONÇA, G.A.; LIRA, G.A. A abelha africanizada como diferencial na apicultura nordestina. In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura, Aracajú, SE, 2006. CD ROOM, Resumo. Aracajú, Confederação Brasileira de Apicultura, 2006.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n.3, p.405-411, 2005.

MIORIN, P. L.; LEVY-JUNIOR, L. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial activity of honey and própolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 913–920, 2003.

MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, v. 73, p.5-28, 1992.

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

NAGAI, T.; INOUE, R.; KANAMORI, N.; SUZUKI, N.; NAGASHIMA, T. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chemistry*, v. 97, p. 256–262, 2006.

NETO, D. J. Apicultura como geração de renda e inserção social: Análise do arranjo produtivo local do sertão Alagoano. Recife, 45p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção – Universidade Federal de Pernambuco), PE, 2008.

NEVAS, M.; LINDSTRÖ, M.; HAUTAMA`KI, K.; PUOSKARI, S.; KORKEALA, H. Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. *International Journal of Food Microbiology* , v. 105, p. 145– 151, 2005.

NEVAS, M. *Clostridium botulinum* in honey production with respect to infant botulism. Dissertação, 79p. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Helsinki, 2006.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 445p, 1997.

NORONHA, P.R.G. Caracterização de méis cearenses produzidos por abelhas africanizadas: parâmetros químicos, composição botânica e colorimetria. Fortaleza, 147p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Universidade Federal do Ceará) 1997.

NZEAKO B C; HAMDI J. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. Medical Sciences, v. 2, p.75-79, 2000.

ODDO, L. P.; BALDI, E.; ACCORTI, E. Diastatic activity in some unifloral honeys. Apidologie, v.21, p.14-24, 1990.

OLDONI, T. L. C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. São Paulo, 105p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, SP, 2007.

OLIVEIRA F. H. P. C. Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: Crescimento e Produção de Lipopeptídio em Cultivo Descontínuos. Recife, 83 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos), Universidade Federal de Pernambuco, PE, 2006.

OSATO, M. S., REDDY, S. G., & GRAHAM, D. Y. Osmotic effect of honey on growth and viability of *Helicobacter pylori*. Digestive Diseases & Sciences, v. 44, p. 462–464, 1999.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions – antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, v. 44, p. 307–315, 1986.

ÖZCAN, M.; ARSLAN, D.; CEYLAN, D. A. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. Food Chemistry, v. 99, p.24-29, 2006.

PAULA NETO, F. L. DE. Principais mercados apícolas mundiais e a apicultura

brasileira. Mensagem doce, São Paulo, v.84, p.2-23, 2005.

PERALTA, R.. M. Procedimento de Isolamento e Fracionamento de Proteínas. In : BRACHT, A; ISHII-IWAMOTO, E. L . Métodos de Laboratório em Bioquímica, São Paulo, Manole, 439 p. 2003.

PEREIRA. M. L., BASTOS. E.M. A. F., DAYRELLI, I. O., MANHANI, M. R., SERRANO, A. M. Identificação e correção de pontos críticos em um apiário. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.16, n.1, p.48-51, 1996.

PEREIRA, J. O. P. Diversidade genética da abelha sem ferrão *Melipona quinquefasciata* baseada no seqüenciamento das regiões ITS1 parcial e 18S do DNA ribossômico nuclear. Fortaleza, 141p. Tese de Doutorado (Pós Graduação em Zootecnia), Universidade Federal do Ceará, 2006.

PEROSA, J. M. Y.; ARAUCO, E. M. R.; SANTOS, M. L. A.; ALBARRACÍN, V. N. Parâmetros de competitividade do mel brasileiro. Informações Econômicas, SP, v.34, n.3, 2004.

PLANO DE AÇÃO APL APICULTURA NO SERTÃO. Programa de mobilização para o desenvolvimento dos arranjos e territórios produtivos locais do Estado de Alagoas, 58p., 2004.

RAGAZANI, A. V. F.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R.; DELFINO, T. P. C.; POIATTI, M. L.; BERCHIELLI, S. P. Esporos de *Clostridium botulinum* em mel comercializado no Estado de São Paulo e em outros Estados brasileiros. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.2, p. 396-399, 2008.

RALL, V.L.M.; BOMBO, A.J.; LOPES, T.F.; CARVALHO, L.R.; SILVA, M.G. Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health? Anaerobe, v.9, p.299–303, 2003.

RESENDE, R.B. Estatísticas sobre exportações brasileiras de mel. (UAGRO/SEBRAE: Unidades de Agronegócios e Territórios Específicos/Serviço Brasileiro de Apoio às micro e pequenas Empresas). Disponível em: <http://www.apis.sebrae.com.br> (acesso em 05 de Outubro de 2008).

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, R. H.; PELUZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies

reativas de oxigênio no meio biológico. Biosciences, v

RODRÍGUEZ, G. O.; FERRER, B. S.; FERRER, A.; RODRÍGUEZ, B. Characterization of honey produced in Venezuela. Food Chemistry, v. 84, p. 499–502, 2004.

SALOMAO, B. C. M.; MASSAGUER, P. R.; ARAGAO, G. M. F. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, p. 116-121, 2008.

SANTOS, K. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Cinética da diastase em méis de diferentes origens florais. Mensagem Doce, p. 2-4, 2003.

SCHEPARTZ, A.I.; SUBERS, M.H. Catalase in honey. Journal of Apiculture Research, v.5, n.1, p. 37-43, 1966.

SEBRAE AGRONEGÓCIOS. SEBRAE. Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia. Revista Sebrae Agronegócios, v.3, 64p, maio de 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS HÍDRICOS – DIRETORIA DE METEOROLOGIA – DMET - AL. Monitoramento climático, análise da precipitação mensal no Estado de Alagoas, 2009.

SEELEY, T.D. Ecologia da abelha, um estudo de adaptação na vida social. Ed. Paixão, Porto Alegre, 2006.

SERRANO, S.; VILLAREJO, M.; ESPEJO, R.; JODRAL, M. Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of *Citrus* and *Eucalyptus* honeys by discriminant analysis. Food Chemistry, v. 87, p. 619–625, 2004.

SHETTY, K. Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. Process Biochemistry, v.39, p.789 – 803, 2004.

SILVA, J. C. S.; LAGES, V. N. A meliponicultura como fator de ecodesenvolvimento na Área de Proteção Ambiental da ilha de Santa Rita, Alagoas. Revista de Biologia e Ciência da Terra, v.1, n.3, 2001.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. Revista

Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 8, n.2-3, 2004.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.3, 2003.

SILVA, A. C. Tipificação de Méis Brasileiros por Micro-extração em Fase Sólida combinada com Cromatografia Gasosa (SPME-CG). Rio de Janeiro, 120p. Tese (Doutorado em Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro), RJ, 2006.

SIMUTH, J. Some Properties of the main protein honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly. *Apibologie*, v. 32, p. 69 – 80, 2001

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA- RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, San Diego, v. 299, p. 152- 178, 1999.

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

SOARES, A.E.E. A importância da pesquisa no desenvolvimento da apicultura e meliponicultura. In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura, Aracajú, SE, 2006. CD ROOM, Resumo. Aracajú, Confederação Brasileira de Apicultura, 2006.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 15, n. 1, 2002.

SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I. P.; CARVALHO, C. A. L. DE. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. *Ciência Rural*, v.37, n.4, 2007.

SOMAL, M.; COLEY, K.; MOLAN, P.; HANCOCK, B. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka honey. *J. Royal Soc. Med.*, v. 87, p. 9–12, 1994.

SOUZA, P. A. Projeto Experimental para transferência, difusão e inovação tecnológica: Setor Apícola de Alagoas. Projeto Aprovado pela Secretaria Executiva

de Ciência e Tecnologia do Estado de Alagoas, 2004.

SOUZA, B. A. Caracterização físico-química e qualidade microbiológica de amostras de mel de abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponinae) do Estado da Bahia, com ênfase em *Melipona Illiger*, 1806, 2008. (Tese de Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.

SOUZA, B. de A.; MARCHINI, L. C.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. de O. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona* Illiger, 1806 (Apidae: Meliponini) da região Nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. Química Nova, v. 32, p. 303-308, 2009

SOUZA, D. C. Adequando a apicultura brasileira para o mercado internacional. In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura, Aracajú, 2006. CD ROOM, Resumo. Aracajú, Confederação Brasileira de Apicultura, 2006a.

SOUZA, J. E. A. DE. Agronegócio da apicultura: estudo da cadeia produtiva do mel em Alagoas. 2006, 181p. Dissertação (mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente: Desenvolvimento Sustentável) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2006b.

SOUZA, B. de A.; CARVALHO, C. A.L. de; SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). Cienc. Rural v.34, n.5, Santa Maria, 2004.

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

SOUZA, R.C.S.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; OLIVEIRA, F.P.M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região Amazônica. Acta Amazonica, v.34, n.2, p.333-336, 2004.

SOUZA, B. A.; ROUBIK, D. W.; BARTH, M. O.; HEARD, T. A.; ENRÍQUEZ, E.; CARVALHO, C. A. L.; VILLAS-BÔAS, J. K.; MARCHINI, L. C.; LOCATELLI, J. C.; PERSANO-ODDO, L.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; BOGDANOV, S.; VIT, P. Composition of stingless bee honey: setting quality

standards. Interciencia, v.31, n.12, Caracas, 2006.

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

SWALLOW, K. W.; LOW, N. H. Analysis and quantification of the carbohydrates in honey using performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 38, p. 1828 – 1832, 1990.

THEUNISSEN, F.; GROBLER, S.; GEDALIA, I. The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. Apidology, v. 32, p.371-379, 2001.

TRABULSI, L. R., ALTHERTUM, F. Microbiologia. Ed. Atheneu. 4ª edição. São Paulo, 2004.

TRUCHADO, P.; LOPEZ-GALVEZ, F.; GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ALLENDE, A. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. Food Chemistry, v.115, p.1337–1344, 2009.

TURKMEN, N.; SARI, F.; POYRAZOGLU, E. S.; VELIOGLU, Y. S. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. Food Chemistry, v.95, p.653–657, 2006.

VARGAS, T. Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos campos gerais do Paraná. Paraná, 2006, 134p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos-Universidade Estadual de Ponta Grossa), 2006.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. Práticas de microbiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Manual de análises físico-químicas do mel. São Paulo: Apacame, 1999.

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

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

WESTON, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, v.71, p.235–239, 2000.

WESTON RJ, MITCHELL KR, ALLEN KL: Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry*, v. 64, 295-301, 1999.

WHITE, J. W. ;SUBERS, M.H.;SHEPARTZ, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.73, p. 57-70, 1963.

WHITE, J. W.; KUSHINIR, I. The enzymes of honey: examination by ion-exchange chromatography, gel filtration, and starch-gel electrophoresis. *Journal of Apiculture Research*, v.6, n.2, p. 69-89, 1967.

WIESE, H. *Nova apicultura*. 6.^a ed. Porto Alegre: Agropecuária, 493p., 1985.

WIESE, H. *Apicultura Novos Tempos*. 2.^a ed. Guaíba: Agrolivros, 378p., 2005.

WINSTON, M. L. *A biologia da abelha*. Tradução OSOWSKI, C. A. Porto Alegre: Magister, 2003.

YANIV. Z.; RUDICH, M. *Bee Products*. Plenum Press, New York. p.232, 1996

YANNIOTIS, S.; SKALTSI, S.; KARABURNIOTI, S. Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, v. 72, p. 372–377, 2006.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787 – 793, 1998.

ZAMORA, M. C.; CHIRIFE, J. Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina. *Food Control*, v. 17, p.59 –64, 2006.

ZAMORA, M. C.; CHIRIFE, J.; ROLDÁN, D. On the nature relationship between water activity and moisture in honey. *Food Control*, v.17, p. 642–647, 2006.

DUARTE, A. W. F. 2009. *Mel de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas: composição química, segurança microbiológica e atividade terapêutica.*

9. APÊNDICE

APÊNDICE 1 – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA “QUÍMICA NOVA”

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MEL DE ABELHAS NATIVAS E AFRICANIZADAS DO ESTADO DE ALAGOAS EM ESTAÇÃO DE SECAS

DUARTE, A. W. F. 2009. Mel de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas: composição química, segurança microbiológica e atividade terapêutica.

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MEL DE ABELHAS NATIVAS E
AFRICANIZADAS DO ESTADO DE ALAGOAS EM ESTAÇÃO DE SECAS**

Alysson Wagner Fernandes DUARTE*; Maria Raphaella dos Santos VASCONCELOS; Adriana Pereira Domarques de MENEZES; Elane Pereira GOMES; Ana Maria Queijeiro LÓPEZ

Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Maceió-AL, CEP 57072-970, bioalysson@gmail.com.

Silvio Chagas da SILVA

Instituto de Computação, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Maceió-AL, CEP 57072-970.

*** bioalysson@gmail.com**

PHYSICO-CHEMICAL EVALUATION OF THE HONEY BEE AND NATIVE
AFRICANIZED OF ALAGOAS STATE IN THE DRY SEASON

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the quality of honey from different entomologic sources of the State of Alagoas, in the dry season of 2008/09, by physico-chemical criteria. Thus, 43 samples of honey (14 of *Apis mellifera* and 29 of native bees) were collected from different municipalities of Alagoas. We used the nonparametric test of *Kruskal Wallis* to 95% ($p < 0.05$), because the data did not show normal distribution. It was also performed the correlation of data by the *Spearman* test to 95% significance, $p < 0.05$, and 99% significance, $p < 0.01$. With regard to the physico-chemical parameters, only electrical conductivity and sucrose showed no statistically significant difference ($p < 0.05$) among the different species of honey bees. Even honeys from different species of bees in the same region showed statistically significant difference ($p < 0.05$) in relation to their chemical composition, emphasizing the importance of a legislation that addresses the range of entomological origin of honeys.

KEYWORDS: Honey, composition physico-chemical, Stingless

INTRODUÇÃO

Face à grande adaptabilidade das abelhas ao clima das diversas regiões onde se instalam, sua criação é uma atividade mundialmente conhecida¹. A composição química do mel é bastante variada, dependendo principalmente da origem floral. No entanto, a origem entomológica deste alimento exerce papel fundamental em sua composição química, visto que diferentes espécies de abelhas possuem hábitos de visitação floral distintos^{2,3}.

A meliponicultura se destina ao estudo de abelhas sem ferrão (nativas), cujas principais espécies de ocorrência na região Nordeste são: *Melipona scutellaris* (Uruçu), *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Melipona subnitida* (Jandaíra)⁴. O mel dessas abelhas é um produto que também tem apresentado uma demanda crescente de mercado em diferentes regiões do Brasil, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis*. Entretanto, ainda existem poucos estudos sobre as características físico-químicas, microbiológicas e nutracêuticas desse produto, dificultando assim a definição de padrões de qualidade para a sua comercialização^{3, 5, 6, 7}.

Enquanto os méis de *A. mellifera* são produzidos e distribuídos principalmente no continente Europeu e Asiático, o mel de abelhas sem ferrão é um alimento conhecido e utilizado na América do Sul, África e Austrália, e tem distribuição limitada a nível mundial, principalmente devido à reduzida produção pelas diferentes espécies de meliponíneos, menor vida útil, face ao teor de umidade desses méis e, ainda, à ausência de uma norma de qualidade institucional, em função da carência de estudos envolvendo tais produtos^{3, 6, 7, 8}.

Diante do exposto, o propósito deste trabalho foi avaliar a qualidade do mel de abelhas nativas e africanizadas coletados na estação seca de 2008/09 em municípios de diferentes mesorregiões do Estado de Alagoas, por meio de parâmetros físico-químicos.

METODOLOGIA

AMOSTRAGEM

Os méis de abelhas nativas (*M. scutellaris*, *M. subnitida*, *M. quadrifasciata* e *Plebeia* sp) foram coletados em meliponários particulares, estando os ninhos acondicionados em ocos de troncos de árvores da forma como foram capturados na natureza, ou em caixas de criação racional. As coletas foram realizadas com auxílio de seringas estéreis descartáveis, na estação seca de 2008/09, sendo transportadas em caixas isotérmicas refrigeradas, para ao laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA), do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) - Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Por outro lado, os méis de *A. mellifera* foram coletados em apiários experimentais instalados com fins de estudo, em municípios representativos de duas mesorregiões – Zona da Mata e Litoral. Após a centrifugação desses méis no local de beneficiamento (casa de mel dos apiários experimentais), os mesmos foram também transportados em caixas isotérmicas refrigeradas, para o LBPVMA/IQB/UFAL, visando sua decantação e posteriores análises.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: umidade ⁹, pH e acidez, glicídios redutores, glicídios totais e sacarose aparente ¹⁰, condutividade elétrica e teor de prolina ¹¹, proteínas totais ¹², atividade diastásica ¹³, hidroximetil-furfural (HMF) ¹¹ e cor ¹⁴.

Para quantificação do teor de proteínas totais e visualização do perfil protéico por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), realizou-se uma extração prévia por precipitação ácida. Solubilizou-se 2,5 g de mel em 7,5 mL de água, e acidificou-se com

HCL 32 % até pH 2. As amostras acidificadas foram mantidas na geladeira por 24 h para facilitar a precipitação e depois centrifugada a 3.800 *g* por 15 min.

O precipitado foi ressuspenso em 7,5 mL de uma solução de clorofórmio-metanol (2:1 v.v⁻¹). Os frascos contendo a solução foram submetidos à agitação oscilatória (250 rpm) por 15 min à temperatura ambiente.

Para visualização do perfil protéico em CCD, 10 µL do extrato protéico de cada amostra de mel foi aplicado em cromatoplaça de alumínio coberta com sílica (0,25 mm de espessura) e com indicador para fluorescência (Merck, 60 F₂₅₄). As cromatografias foram desenvolvidas no sistema de solventes: clorofórmio: metanol (65:25 v:v), sendo reveladas com solução de ninhidrina 7,5 % em metanol e acetona (1:1 v:v), seguida por aquecimento a 105 °C (5 min).

Para avaliação qualitativa do perfil de aminoácidos nos diferentes méis, dois sistemas de extração de aminoácidos livres foram testados - um direto, empregando hidrólise ácida ¹¹, e outro a partir de extratos protéicos de mel, obtidos para quantificação de proteínas totais. Para tanto, alíquotas de 25 µL dos extratos aquosos hidrolisados em ácido fórmico foram aplicadas em cromatoplaças de alumínio coberta com sílica (0,25 mm de espessura) e contendo indicador para fluorescência (Merck, 60 F₂₅₄). As cromatografias foram desenvolvidas no sistema de solventes butanol: ácido acético: água (4:1:1 v:v:v) clorofórmio: metanol (65:25 v:v), sendo reveladas com solução de ninidrina 7,5 % em etanol e acetona (1:1 v:v), seguida por aquecimento a 105 °C (5 min).

DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Antes de proceder-se a avaliação dos dados, testou-se a normalidade dos mesmos pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*, premissa para a escolha do teste estatístico a ser aplicado. Foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal Wallis* ao nível

de 95 % de significância, ($p < 0,05$), pois os dados não apresentaram distribuição normal. Realizou-se ainda a correlação de *Spearman* a 95 % de significância, $p < 0,05$ e 99% de significância, $p < 0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros Físico-químicos dos méis

A Tabela 1 apresenta dados de altitude, temperatura e índice pluviométrico dos municípios onde as coletas das amostras de mel foram realizadas. Por outro lado as Tabelas 2 e 3 apresentam um sumário das médias obtidas em todos os parâmetros físico-químicos analisados nas 43 amostras de méis (14 de *A. mellifera*, 22 de *M. scutellaris*, 03 de *M. quadrifasciata*, 02 de *M. subnitida* e 02 de *Plebeia* sp).

A Tabela 4 apresenta a escala crescente de diferença entre as médias estabelecida através de um *ranking* de 1-5 de cada parâmetro físico-químico entre os méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas (coletados durante a estação de seca 2008/09). A Tabela 5 apresenta a correlação de *Spearman* a 95 % de significância, $p < 0,05$ e 99% de significância, $p < 0,01$.

Determinação de Umidade

No tocante ao teor de umidade nos diferentes méis avaliados, constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as amostras (Tabela 4), sendo este menor em mel de *A. mellifera* (17,5 - 24,0 %, média $19,79 \pm 1,48\%$), do que nas amostras de mel de nativas, na seguinte ordem crescente: *M. quadrifasciata* ($28,50 \pm 1,32$) < *M. scutellaris* ($29,51 \pm 3,53\%$) < *M. subnitida* ($30,50 \pm 2,12$ %) < *Plebeia* sp ($31,75 \pm 3,88\%$), Tabela 2.

Com relação ao mel de *A. mellifera*, portanto, apenas 3 amostras apresentaram

valores excedentes a 20 % de umidade, que é o limite estabelecido pela legislação. O índice de umidade dos méis de abelhas nativas não atendeu essa legislação, embora a mesma seja exclusiva de méis de abelhas africanizadas. Todas as amostras de nativas apresentaram conteúdo de umidade próximo ao de méis de outras espécies do gênero *Melipona*^{3, 8, 15}.

Estudos sobre as características físico-químicas de méis de *M. scutellaris* provenientes dos Estados da Bahia e da Paraíba, por exemplo, demonstraram que estes apresentaram 28,40% de umidade¹⁶.

Determinação de pH e acidez livre

Com relação ao pH e à acidez livre dos méis das diferentes espécies avaliadas, verificou-se diferença estatisticamente significativa (Tabela 4). O pH dos méis de *A. mellifera* variou de 3,43-6,54 (média $4,43 \pm 0,91$), enquanto que o de mel de *M. scutellaris* variou entre 3,83 e 6,90 (média de $5,14 \pm 1,20$). Méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp apresentaram pH médio de $3,62 \pm 0,20$, $3,56 \pm 0,26$ e $3,92 \pm 0,29$, respectivamente, Tabela 2.

Em relação à acidez livre, a média foi de $28,71 \pm 12,49$ meq. Kg⁻¹ nos méis de *A. mellifera*, sendo que apenas uma amostra de mel de *A. mellifera* apresentou-se fora das recomendações estabelecidas pela legislação (BRASIL, 2000), que é de no máximo 50 meq . Kg⁻¹. Entretanto, em relação aos méis de meliponíneos, observou-se ampla variação (2,4- 170,4 meq. Kg⁻¹), sendo o maior valor para o mel de *Plebeia* sp. Foi observada uma correlação negativa (-0,808) entre acidez livre e pH.

O pH e a acidez podem ser diretamente relacionados à composição florística nas áreas de coleta, uma vez que podem ser influenciados pelo pH e variação de ácidos orgânicos do néctar, o qual é submetido à ação da glicose-oxidase que forma o ácido

glucônico, mas também à ação de enzimas bacterianas durante a sua maturação, e, ainda, pela quantidade de minerais presentes, e diferenças na composição do solo ou associação de espécies vegetais para a composição final ^{11, 17, 18, 19}. Evangelista-Rodrigues *et al.* (2005) ¹⁸, por exemplo, observaram que houve diferença significativa de pH entre os méis de *M. scutellaris* e *A. mellifera*, mesmo quando produzidos em uma mesma localidade, fator que pode ser explicado pela presença de substâncias mandibulares acrescidas ao néctar durante o transporte do mesmo até a colméia. Alves *et al.* (2005) ¹⁵, por outro lado, constataram variação de acidez livre de 18,5 a 62,5 meq. Kg⁻¹ entre méis de nativas no município de São Gabriel, no Estado da Bahia. Souza (2008) ⁸, também avaliando a qualidade físico-química de méis de abelhas nativas do Estado da Bahia, observou uma variação de pH entre 3,12 a 6,5, enquanto que o teor de acidez variou entre 5,1 a 116,8 meq. Kg⁻¹.

Determinação de Condutividade Elétrica

Em relação à condutividade elétrica (Tabela 4), não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os méis das diferentes abelhas estudadas no Estado de Alagoas na estação seca de 2008/09. A condutividade elétrica variou de 0,27-1,15 mS.cm⁻¹ para os méis de abelhas africanizadas, e de 0,23-1,16 mS.cm⁻¹ para os méis de *M. scutellaris*. No entanto, nos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp, a condutividade foi respectivamente de $0,63 \pm 0,11$ mS.cm⁻¹, $0,57 \pm 0,03$ mS.cm⁻¹ e $0,84 \pm 0,08$ mS.cm⁻¹, Tabela 2.

Os conteúdos de ácidos orgânicos, sais minerais e proteínas interferem na condutividade elétrica do mel ^{17, 20}. De acordo com Souza *et al.* (2004) ⁶, a condutividade elétrica de méis de *M. asilvai* produzidos na Bahia variou de 287,5 a 525 μ S.cm⁻¹. Souza *et al.* (2006) ⁷ também constataram que a condutividade elétrica em méis de diferentes meliponíneos de regiões geográficas distintas variou entre 0.49 e 8.77 mS.cm⁻¹.

Determinação de Proteínas Totais

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os méis das diferentes espécies avaliadas em relação ao conteúdo de proteínas totais (Tabela 6), sendo a menor concentração detectada em mel de *M. subnitida*, seguida por *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata*, *A. mellifera*, *Plebeia* sp, Tabela 5. Em mel de *A. mellifera*, esse parâmetro variou de 5,02-10,43 eq. mg de albumina. 100 g⁻¹ (média de $7,27 \pm 1,51$ eq. mg de albumina. 100 g⁻¹). No entanto, em méis de meliponíneos variou de 3,81-19,19 eq. mg de albumina. 100 g⁻¹, sendo este conteúdo maior no mel de *Plebeia* sp, Tabela 2.

Segundo Arruda *et al.* (2004)²³, o conteúdo de proteínas totais em mel de abelhas africanizadas varia de 0,0036-2,79 %. Em estudos de Alves (2008)²⁴, envolvendo mel orgânico de *A. mellifera* em uma APA do Paraná, o conteúdo de proteínas totais variou de 0,37-0,63 %, com valor médio de $0,50 \pm 0,07$ %. Por outro lado, quando Souza (2008)⁸ estudou esse parâmetro em méis de nativas do Estado da Bahia, observou uma variação de 0,04 a 2,37 %, enquanto que Almeida-Anacleto (2007)³ observou uma variação entre 0,15 a 0,57 % para méis de nativas no município de Piracicaba, em São Paulo, ocorrendo o menor conteúdo no mel de *Scaptotrigona bipunctata*, e o maior no mel de *Tetragonisca angustula*. Entretanto, o método utilizado para tais quantificações percentuais é o Kjeldahl, que se fundamenta na correlação entre nitrogênio total e conteúdo total de proteínas, mais esse pode superestimar os resultados, considerando-se que há no mel aminoácidos livres que também responderão às reações. No método de Lowry, entretanto, as reações envolvem as ligações peptídicas¹².

Dois métodos de extração de proteínas foram comparados visando obter-se o melhor perfil cromatográfico das mesmas em camada delgada (CCD), e a mais eficiente quantificação. No primeiro utilizou-se acetona a -20° e no segundo HCl:clorofórmio:metanol. O método mais eficiente para ambos foi aquele que partiu da

suave precipitação ácida, revelando que o perfil de bandas protéicas entre os méis de abelhas africanizadas e nativas foi semelhante [fatores de retenção (Rfs) variaram entre 0,53 e 0,58]. É de conhecimento que a concentração de proteínas em mel é muito baixa, provavelmente restrita às oxidases e hidrolases.

Determinação de Prolina

Em relação ao conteúdo de prolina, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os méis de diferentes origens (Tabela 4), sendo estes classificados em ordem crescente de concentração de prolina da seguinte forma: *M. scutellaris* < *M. subnitida* < *M. quadrifasciata* < *A. mellifera* < *Plebeia* sp (Tabela 4). O mel de *A. mellifera* apresentou variação entre 40,31-149,12 eq. mg de prolina.100 g⁻¹ (média de $74,10 \pm 31,77$ eq. mg de prolina.100 g⁻¹), enquanto os méis de *M. scutellaris* apresentaram variação de 8,71-36,25 eq. mg de prolina.100 g⁻¹ (média de $20,16 \pm 9,37$ eq. mg.100 g⁻¹), e os méis de *M. subnitida*, *M. quadrifasciata* e *Plebeia* sp apresentaram respectivamente médias de $27,29 \pm 10,33$, $30,07 \pm 18,51$ e $94,26 \pm 84,59$ eq. mg de prolina.100 g⁻¹, Tabela 2. Portanto, com exceção do mel de *Plebeia* sp, todos os demais méis de nativas apresentaram teor de prolina inferior ao de abelhas africanizadas. Verificou-se correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o conteúdo de prolina e proteínas totais (0,378) e atividade diastásica (0,803), Tabela 5.

Segundo o manual “*HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION*”, o teor de prolina em mel não deve ser inferior a 0,18 mg. g⁻¹, sendo este utilizado para avaliação da qualidade, estimando-se o grau de maturidade do mel e a detecção de adulteração por sacarose comercial, isto é, quando não for detectada prolina, o produto provavelmente foi adulterado com xarope açucarado. No entanto, esse limite é relacionado ao mel de *A. mellifera*, não atendendo as particularidades dos méis de

abelhas nativas, uma vez que não há legislação específica para tais méis.

Em méis de *A. mellifera* de diferentes origens florais, observou-se uma variação de 437,8 a 2169,4 eq. mg de prolina. Kg⁻¹, com média de 980,95 ± 400,74 eq. mg de prolina. Kg⁻¹ ²⁵. Cotte *et al.* (2004) ²⁶ avaliaram os aminoácidos livres em mel de abelhas africanizadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e confirmando que o principal aminoácido livre do mesmo é a prolina, e que a técnica é eficiente para certificar a natureza genuína do mel.

Dois sistemas de extração de aminoácidos livres de mel foram testados através de hidrólise ácida: um direto através do extrato aquoso com ácido fórmico ¹¹, e outro a partir dos extratos protéicos previamente obtidos por suave precipitação ácida. Com relação à resolução do perfil cromatográfico (CCD) dos aminoácidos livres e à quantificação de prolina, verificou-se que o primeiro método (hidrólise com ácido fórmico) foi mais elucidativo. A submissão dos padrões à hidrólise ácida mostrou-se mais correta, confirmando que todas as amostras apresentaram uma banda com Rf = 0,15, igual a desses padrões utilizados.

Determinação de Glicídios Redutores, Glicídios Totais e Sacarose

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes méis avaliados em relação ao conteúdo GR e GT, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quanto ao conteúdo de sacarose (Tabela 4).

O percentual de GR em mel de *A. mellifera* foi de 70,91 ± 4,91 %, enquanto que o de GT foi de 75,09 ± 4,24 %. Já em relação a mel de *M. scutellaris*, o conteúdo de GR variou entre 57,87 e 75,30 % (média de 66,73 ± 4,25 %), enquanto que o de GT variou de 59,52 a 75,30 % (média de 70,28 ± 4,37 %), Tabela 3. Em estudos de méis de *A. mellifera* de diferentes floradas no Estado do Piauí, Silva *et al.* (2004) ²¹ já haviam detectado um

percentual médio de GR de 77,25 %, com variação entre 68,92 e 85,49 g . 100 g⁻¹, enfatizando a influência da origem floral na composição química desse mel.

Em relação aos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp, o conteúdo de GR variou respectivamente entre 67,20 e 72,67%, 73,52 e 74,40% e 69,44 e 70,22 %. No que, se refere ao conteúdo médio de GT, este foi respectivamente de 72,96 ± 0,97 % , 75,30 ± 0,0 % e 71,03 ± 1,14 %, Tabela 3. Em município da região semi-árida do Estado da Bahia, Alves *et al.* (2005) ¹⁵ detectaram que o conteúdo de GR de mel de *M. mandaçaia* variou entre 64,29% e 82,10%, com média de 74,82 ± 4,28 %, semelhante aos valores encontrados para os méis de abelhas nativas estudados na presente dissertação.

No tocante ao percentual de sacarose, este variou entre 1,56 e 7,52% (média de 3,97 ± 1,88 %) para méis de *A. mellifera*, sendo que duas amostras apresentaram valores superiores ao limite de 6% preconizado pela legislação ²². Uma média de 3,37 ± 1,93 % de sacarose foi detectada em méis de *M. scutellaris*, enquanto que os de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp apresentaram respectivamente 2,78 ± 1,81 %, 1,27 ± 0,59 % e 1,13 ± 0,58 % de sacarose, todos com teores abaixo do limite estabelecido pela legislação para méis de abelhas africanizadas, já que não há padrões para méis de nativas. Foi observada uma correlação positiva entre glicídios redutores e glicídios totais (0,896) e negativa entre glicídios totais e sacarose (-0,309) .

Determinação de Diastase

A composição enzimática de qualquer mel está diretamente relacionada às fontes vegetais e entomológicas das quais ele é derivado ¹⁷. Este fato dificulta a proposição de uma única norma para todo o Brasil, país rico em espécies de meliponíneos e caracterizado por um grande mosaico de habitats e formações vegetais. Ao mesmo tempo, são escassas as informações nesse sentido e específicas dos méis de todo o país ²⁷.

A legislação brasileira ²² estabelece um valor mínimo de atividade diastásica de 8 Gothe (G) para classificação do mel de boa qualidade. Os resultados obtidos nas amostras de méis de *A. mellifera* revelam que, no tocante a esse parâmetro, com exceção da amostra M7 (4,5 G), todas as demais possuem boa qualidade (variação de 4,50-51,45 G, média de $24,87 \pm 12,06$ G). Observou-se ainda uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre o conteúdo de diastase e proteínas totais (0,325) e entre o conteúdo de diastase e teor de prolina (0,803), $p < 0,01$, Tabela 5.

No entanto, ocorreu diferença estatisticamente significativa quanto ao conteúdo de diastase (Tabela 4) nos méis de abelhas nativas. Em méis de *M. scutellaris*, o índice de diastase variou de 2,39 a 18,60 G (média de $5,87 \pm 4,07$ G). Já nos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp, esse índice variou respectivamente de 2,07-28,30, 4,68-8,36 e 16,71-19,20 G, Tabela 3. Isso significa que se a mesma legislação de méis de abelhas africanizadas estivesse vigorando para méis de nativas, apenas as amostras com índice de diastase menor do que 8G estariam fora dos padrões de qualidade. Porém, uma vez que a acidez desses méis não foi alta na maioria das amostras o suficiente para destruir tal enzima ^{28, 29}, é possível que os mesmos apresentassem baixas concentrações de maltose e oligossacarídeos indutores da expressão da diastase, corroborando a necessidade de uma legislação específica para tais méis ¹⁷.

Determinação de Hidroxi-Metil-Furfuraldeído (HMF)

No que se refere ao teor de HMF, ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes méis (Tabela 4), variando este entre 1,5 e 128,2 mg .Kg⁻¹ (média de $45,97 \pm 37,52$) nos méis de *A. mellifera*. Nestes, 4 amostras de mel comercial excederam o limite permitido pela legislação, que é de no máximo 60 mg .Kg⁻¹.

Em relação aos méis de *M. scutellaris*, o conteúdo de HMF variou de 0-80,1 mg.

Kg^{-1} , (média de $13,20 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$), enquanto nos de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp a média deste foi respectivamente de 7,46 , 4,4 e $21 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de mel. Apenas uma amostra de mel de *M. scutellaris* excedeu o limite desse parâmetro permitido pela legislação para méis de abelhas africanizadas.

Uma pequena quantidade de HMF é encontrada em méis recém-colhidos, no entanto, o conteúdo de HMF no mel pode ser afetado pela acidez, pH, conteúdo de água e minerais, além de condições de armazenamento, especialmente elevadas temperaturas ^{11, 17, 28, 29, 30}. Valores elevados de HMF encontrados nos méis de meliponíneos podem estar associados às técnicas inadequadas de manejo e/ou condições climáticas adversas da região ^{6, 7, 8}.

Determinação da Cor

Em relação à coloração, parâmetro considerado essencial para atrair o consumidor do mel, as amostras de *A. mellifera* oscilaram de 23,3 a 108,0 mm Pfund, variando do branco ao âmbar, sendo a média de $56,31 \pm 26,79 \text{ mm Pfund}$ (âmbar claro). Méis de *M. scutellaris* apresentaram coloração oscilando entre 27,4 e 196,4 mm Pfund, variando do branco ao âmbar escuro (média de $104,79 \pm 52,53 \text{ mm Pfund}$ = âmbar). Quanto aos méis de *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia* sp a variação de coloração foi respectivamente de 45,6-264,0, 39,7-51,2 e 199,0-249,1 mm Pfund, sendo o mel de *Plebeia* sp diferenciado, pois apresentou uma coloração âmbar escuro, Tabela 3.

A cor do mel está correlacionada com sua origem floral, processamento, armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo de néctar e a temperatura na qual o mel é produzido no interior da colméia ^{3, 31}. Turkmen *et al.* (2006) ³² observaram que o tratamento térmico de mel de *A. mellifera* levou ao escurecimento, provocado pela formação de produtos da reação de *Maillard*, como melanoidinas e HMF, alterações indesejáveis para o consumidor.

CONCLUSÃO

Apenas condutividade elétrica e sacarose não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre méis das distintas espécies de abelhas coletados na estação seca 2008/09. Mesmo quando estes pertenciam a uma mesma região, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação à sua composição química, ressaltando a importância de uma legislação que atenda a essa necessidade conforme a variação entomológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - LENGLER, S. CBA, 2007, 16., disponível em <http://www.brasilapicola.com.br/files/PRODUTOS%20DAS%20ABELHAS%20NA%20S%C3%94ADE%20HUMANA.pdf>, acessado em 10 de maio 2009.
- 2 - ZAMORA, M. C.; CHIRIFE, J. Food Control, 2006, 17, 59 –64.
- 3 - ALMEIDA-ANACLETO, D. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007.
- 4 – LOCATELLI, J. C.; MEDEIROS, L.; SANTANA, W. C., Congresso Brasileiro de Apicultura, Salvador, Bahia, 201, 2008.
- 5 – NOGUEIRA-NETO, P. Nogueirapis, 1997, cap. 2.
- 6 – SOUZA, B. de A.; CARVALHO, C. A.L. de; SODRÉ, G. da S.; MARCHINI. L. C. Cienc. Rural, 2004, 34, 5.
- 7 – SOUZA, B. A.; ROUBIK, D. W.; BARTH, M. O.; HEARD, T. A.; ENRÍQUEZ, E.; CARVALHO, C. A. L.; VILLAS-BÔAS, J. K.; MARCHINI, L. C.; LOCATELLI, J. C.;

DUARTE, A. W. F. 2009. *Mel de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas: composição química, segurança microbiológica e atividade terapêutica.*

PERSANO-ODDO, L.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; BOGDANOV, S.; VIT, P. Interiencia, 2006, 31, 12.

8 – SOUZA, B. A. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, Brasil 2008.

9 – AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Washington, 1170p. 1997.

10 – VARGAS, T. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil, 2006.

11 – BOGDANOV, S. International Honey Commission, 2002, 62.

12 – ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Quím. Nova, 1998, 21, 6, 787 – 793.

13 – SANTOS, K. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Mensag. Doce, 2003, 2, 4.

14 – BIANCHI, E. M. Santiago Del Estero: Unse, CEDIA, 1989.

15 - ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. Ciênc. Tecnol. Alimentos, 2005, 25, 644-650.

16 – MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; TEXEIRA, G. M.; OLIVEIRA, P. C. F.; RUBIA, V. R. XII Congresso Brasileiro de Apicultura, Salvador, Bahia, 201, 1998.

17 – CRANE, E. O São Paulo: Nobel, 226p. 1983.

18 – EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M.S.; BESERRZ, E. M. F.; RODRIGUES, M. L Ciência Rural, 2005, 35, 166-1171.

19 – MOREIRA, R, F. A.; DE MARIA, C. A.B. Quím. Nova, 2001, 24, 4.

20 – ACQUARONE, C.; BUERA, P.; ELIZALDE, B. Food Chemistry, 2007, 101, 695– 703.

21 - SILVA, C. L; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Eng. Agríc. Ambient, 2004, 8, 2-3.

DUARTE, A. W. F. 2009. *Mel de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas: composição química, segurança microbiológica e atividade terapêutica.*

22 – BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Portaria nº367, 04 de setembro de 2000.

23 – ARRUDA, C. M. F.; MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S.; MORETI, A C. C. C. Braz. Ind.Anim., 2004, 61, 2, 141-150.

24 - ALVES. A. M. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Brasil, 2008.

25 - MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J. NACOULMA, O. G. Food Chemistry, 2005, 91, 571–577.

26 - COTTE, J. F.; CASABIANCA, H.; GIROUD, B.; ALBERT , M.; LHERITIER , J.;; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Anal Bioanal Chem, 2004, 378, 1342–1350.

27 - VILLAS-BÔAS, J. H.; MALASPINA, O. Mensagem Doce, 2005, 82.

28 – VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Mensag. Doce, 1999, 2, 1-16.

29 – MARCHINI, L.C.; SOUZA, B. de A. In: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura, Aracajú, Brasil, 2006.

30 – BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L. P. Apidologie, 2004, 35, 4-17.

31 – ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. Ciênc. Tecnol. Alimentos, 2005, 25, 644-650.

32 – TURKMEN, N.; SARI, F.; POYRAZOGLU, E. S.; VELIOGLU, Y. S. Food Chem., 2006, 95, 653–657.

TABELA 1 – Municípios de coleta das amostras de mel (com códigos) de abelhas nativas e africanizadas, temperatura e índice pluviométrico dos mesmos na estação seca de 2008/09.

Municípios de Coleta de Mel	Amostras*	Altitude (m) **	Temperatura Média (°C) **	Índice Pluviométrico (mm) **
Barra de Santo Antônio (Litoral Norte)	AU1, AU2, AU3, AU11, AU12	10	29	2404,5
Barra de São Miguel (Litoral Sul)	M13	2	29	2050
Colônia Leopoldina (Região Canavieira)	AU8, AU9, AU10	140	22	1393,1
Delmiro Gouveia (Sertão – Rio São Francisco)	AM1, AM2, AM3, AJ1, AJ2, AP1, AP2	256	31	481,3
Ibateguara (Região Canavieira)	AU5, AU6, AU7	505	22	1600
Mar Vermelho (Mata Atlântica)	M9, M10,	636	26	1550
Marechal Deodoro (Litoral Sul)	AU13	5	26	1872,4
Palmeira dos Índios (Agreste)	AU4, AU14, AU15, AU16, AU17, AU18, AU19, AU20, AU21, AU22	290	30	1102,7
Viçosa (Mata Atlântica)	M3, M8, M11, M14	210	29	1500

**Amostras: M3, M8-11, M13-14: Mel de *Apis mellifera*; M1-2, M4-7 e M12: mel comercial de *A. mellifera*; AU: mel de Uruçú (*M. scutellaris*); AM: mel de Mandaçaia (*M. quadrifasciata*); AJ: mel de Jandaíra (*M. subnitida*); AP: mel de Mirim (*Plebeia* sp). ** Dados da SRHMA -AL, 2009.

TABELA 2 – Determinação de umidade (%), pH, acidez livre (meq. Kg⁻¹), condutividade elétrica (mS. cm⁻¹), proteínas totais (mg . 100g⁻¹), prolina (mg . 100g⁻¹), glicídios redutores, glicídios totais e sacarose (%), diastase (G), HMF (mg . Kg⁻¹) e cor (mm Pfund) em mel de abelhas nativas e africanizadas de Alagoas na estação seca de 2008/09.

Amostra	Umidade (%)	pH	Acidez (meq. Kg ⁻¹)	Condutividade elétrica (mS. cm ⁻¹)	Proteínas (mg . 100g ⁻¹)	Prolina (mg . 100g ⁻¹)
<i>Apis mellifera</i>	19,79 ± 1,48	4,43 ± 0,91	28,71 ± 12,49	0,59 ± 0,25	7,27 ± 1,51	74,10 ± 31,77
<i>M. scutellaris</i>	29,51 ± 3,53	5,14 ± 1,20	21,74 ± 25,33	0,55 ± 0,24	5,88 ± 2,47	20,16 ± 9,37
<i>M. quadrifasciata</i>	28,50 ± 1,32	3,62 ± 0,20	44,32 ± 9,62	0,63 ± 0,11	5,55 ± 0,45	30,07 ± 18,51
<i>M. subnitida</i>	30,50 ± 2,12	3,56 ± 0,26	51,94 ± 11,39	0,57 ± 0,03	5,29 ± 0,43	27,29 ± 10,33
<i>Plebeia</i> sp	31,75 ± 3,88	3,92 ± 0,29	130,24 ± 56,78	0,84 ± 0,08	12,84 ± 8,98	94,26 ± 84,59

TABELA 3 – Determinação de glicídios redutores, glicídios totais, sacarose (%), diastase (G), HMF (mg . Kg⁻¹) e cor (mm Pfund) em mel de abelhas nativas e africanizadas de Alagoas na estação seca de 2008/09.

Amostra	Glicídios Redutores (%)	Glicídios Totais (%)	Sacarose (%)	Diastase (G)	HMF (mg . Kg ⁻¹)	Cor (mm Pfund)
<i>Apis mellifera</i>	70,91 ± 4,91	75,09 ± 4,24	3,97 ± 1,88	24,87 ± 12,06	45,97 ± 37,52	56,31 ± 26,79 Âmbar claro
<i>M. scutellaris</i>	66,73 ± 4,25	70,28 ± 4,37	3,37 ± 1,93	5,87 ± 4,07	13,20 ± 17,07	104,79 ± 52,53 Âmbar
<i>M. quadrifasciata</i>	70,03 ± 2,73	72,96 ± 0,97	2,78 ± 1,81	13,09 ± 13,60	7,46 ± 6,55	131,51 ± 116,39 Âmbar Escuro
<i>M. subnitida</i>	73,96 ± 0,62	75,3 ± 0	1,27 ± 0,59	6,52 ± 2,6	4,40 ± 6,22	45,41 ± 8,13 Âmbar Extra Claro
<i>Plebeia</i> sp	69,83 ± 0,55	71,03 ± 1,14	1,13 ± 0,57	17,95 ± 1,76	21 ± 2,12	224,05 ± 35,46 Âmbar Escuro

TABELA 4 – *Ranking* (1-5) comparativo das médias estatisticamente diferentes entre si para cada parâmetro físico-químico entre os méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas (coletados durante a estação de seca 2008/09), segundo teste não paramétrico de *Kruskal Wallis*. Méis com números iguais a 1 não foram diferentes entre si, e a partir desse, as médias foram diferentes em ordem crescente.

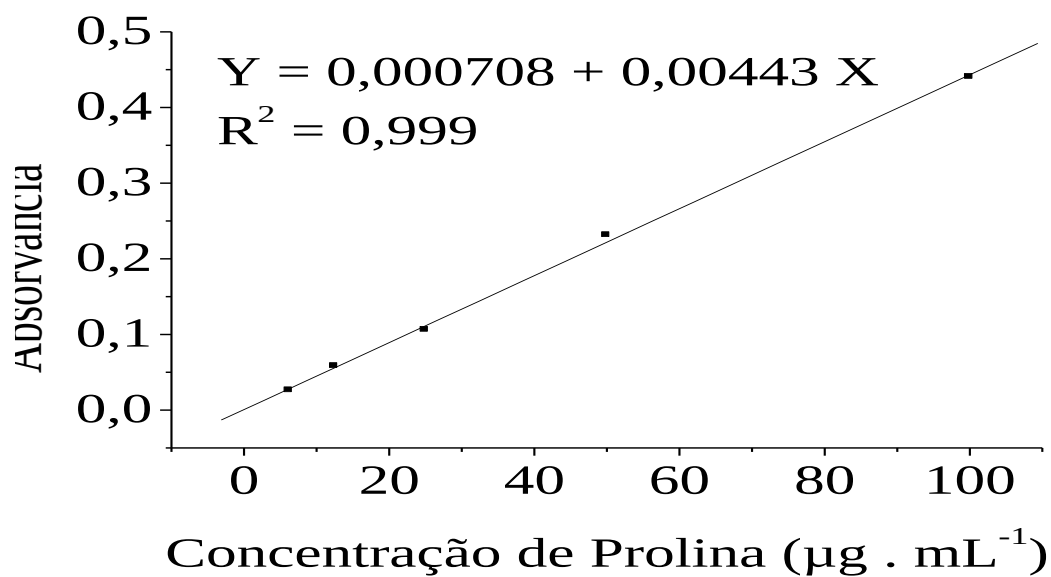
MÉIS DE ABELHAS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICO	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Melipona quadrifasciata</i>	<i>Melipona subnitida</i>	<i>Plebeia</i> sp
Umidade (%)	1	3	2	4	5
pH	4	5	3	1	2
Acidez (meq. Kg ⁻¹)	2	1	3	4	5
Cond. Elétrica (mS. cm ⁻¹)	1	1	1	1	1
Proteína (mg . 100g ⁻¹)	4	2	3	1	5
Prolina (mg . 100g ⁻¹)	5	1	3	2	4
GR (%)	4	1	3	5	2
GT (%)	4	2	3	5	1
Sac (%)	1	1	1	1	1
Diastase (G)	5	1	3	2	4
HMF (mg . Kg ⁻¹)	5	3	2	1	4
Cor (mm Pfund)	2	3	4	1	5

TABELA 5 – Coeficiente de correlação de *Spearman* entre os parâmetros físico-químicos de méis de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas, durante a estação de seca 2008/09.

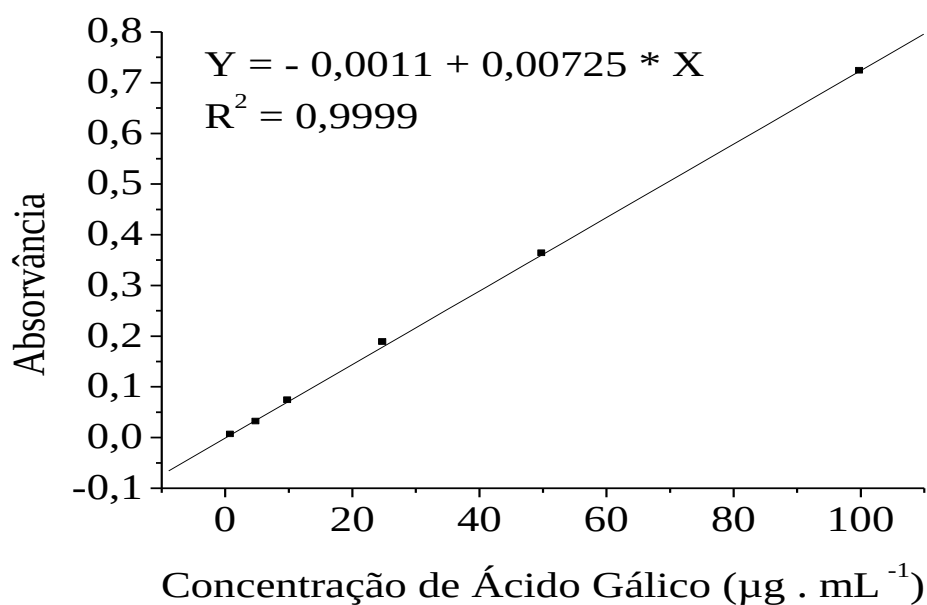
PARÂMETROS FÍSICO- QUÍMICOS	Umidade (%)	pH	Acidez meq. Kg ⁻¹	Con. Elet. mS. Cm ⁻¹	Proteína mg . 100g ⁻¹	Prolina mg . 100 g ⁻¹	GR (%)	GT (%)	Sac (%)	Diastase G	HMF mg . Kg ⁻¹
Umidade (%)	1,000	0,072	-0,014	-0,126	-0,303(*)	-0,697(**)	-0,392(**)	-0,434(**)	-0,250	-0,605(**)	-0,369(*)
pH	0,072	1,000	-0,808(**)	0,288	-0,111	-0,409(**)	-0,421(**)	-0,372(*)	0,108	-0,274	-0,119
Acidez meq. Kg ⁻¹	-0,014	-0,808(**)	1,000	0,041	0,205	0,396(**)	0,455(**)	0,319 (*)	-0,231	0,378(*)	0,047
Con. Elétrica mS. cm ⁻¹	-0,126	0,288	0,041	1,000	-0,048	0,146	0,050	-0,092	-0,210	0,272	-0,104
Proteína mg . 100g ⁻¹	-0,303(*)	-0,111	0,205	-0,048	1,000	0,378(*)	0,212	0,099	-0,185	0,325(*)	0,376(*)
Prolina mg . 100g ⁻¹	-0,697(**)	-0,409(**)	0,396(**)	0,146	0,378(*)	1,000	0,429(**)	0,428(**)	0,165	0,803(**)	0,387(*)
Glicídios Redutores (%)	-0,392(**)	-0,421(**)	0,455(**)	0,050	0,212	0,429(**)	1,000	0,896(**)	-0,309(*)	0,292	0,312(*)
Glicídios Totais (%)	-0,434(**)	-0,372(*)	0,319(*)	-0,092	0,099	0,428(**)	0,896(**)	1,000	0,078	0,251	0,377(*)
Sacarose (%)	-0,250	0,108	-0,231	-0,210	-0,185	0,165	-0,309(*)	0,078	1,000	0,091	0,205
Diastase G	-0,605(**)	-0,274	0,378(*)	0,272	0,325(*)	0,803(**)	0,292	0,251	0,091	1,000	0,262
HMF mg . Kg ⁻¹	-0,369(*)	-0,119	0,047	-0,104	0,376(*)	0,387(*)	0,312(*)	0,377(*)	0,205	0,262	1,000

* 95% de significância, p < 0,05, ** 99% de significância, p < 0,01.

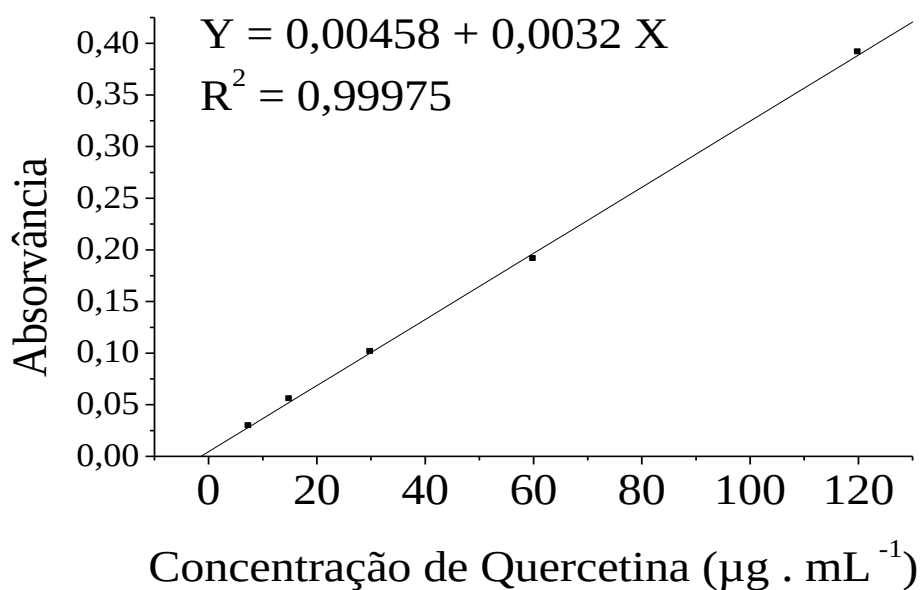
APÊNDICE 2 – CURVAS PADRÃO



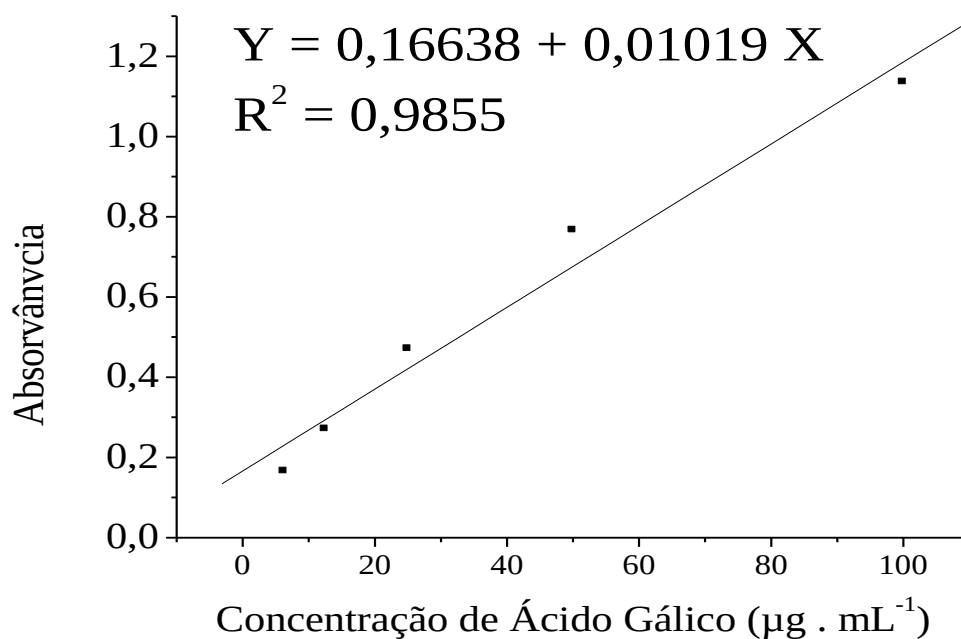
APÊNDICE 2.1 – Curva padrão de solução aquosa de prolina para o ensaio de quantificação de prolina em amostras de mel.



APÊNDICE 2.2 – Curva padrão de solução aquosa de ácido gálico no ensaio de determinação de compostos fenólicos totais.



APÊNDICE 2.3 – Curva padrão de solução metanólica de quercetina no ensaio de determinação de flavonóides totais em amostras de mel.



APÊNDICE 2.4 - Curva padrão de solução aquosa de ácido gálico no ensaio de determinação do poder antioxidante de redução de ferro (FRAP).