

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

MURILO KEITH UMADA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO CORRELACIONADO AS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE AMOSTRAS DO MEL DE
Tetragonisca angustula Latreille, 1811 (HYMENOPTERA: APIDAE)
PRODUZIDO NO ESTADO DO PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO
2014

MURILO KEITH UMADA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO CORRELACIONADO AS
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE AMOSTRAS DO MEL DE
Tetragonisca angustula Latreille, 1811 (HYMENOPTERA: APIDAE)
PRODUZIDO NO ESTADO DO PARANÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso de Engenharia Ambiental da Coordenação de Engenharia Ambiental – COEAM - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elizabete Satsuki Sekine
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Agenor Alves Bueno

CAMPO MOURÃO
2014



TERMO DE APROVAÇÃO

POTENCIAL ANTIMICROBIANO CORRELACIONADO AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE AMOSTRAS DO MEL DE *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (HYMENOPTERA: APIDAE) PRODUZIDO NO ESTADO DO PARANÁ

por

MURILO KEITH UMADA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 28 de fevereiro de 2014 como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após a deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

PROF^a. DR^a. ELIZABETE SATSUKI SEKINE

PROF. DR. PAULO AGENOR ALVES BUENO

PROF^a. DR^a. DÉBORA CRISTINA DE SOUZA

PROF^a. DR^a. MARIA JOSIANE SEREIA

À minha mãe e ao meu pai pelos ensinamentos, educação e apoio incondicional em todos os momentos. As minhas irmãs pelo carinho e apoio prestado.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Elizabete Satsuki Sekine, pela confiança no meu trabalho, orientação, ensinamentos, atenção e dedicação durante o tempo que trabalhamos juntos;

Ao Professor Doutor Paulo Agenor Alves Bueno, pela coorientação, esclarecimento de dúvidas, as novas ideias que contribuíram com o trabalho, a disponibilidade e atenção ao ajudar;

À Professora Doutora Débora Cristina de Souza, que sempre esteve por perto durante a pesquisa contribuindo com novas ideias e sugestões;

À banca examinadora pelas correções, sugestões e contribuições para o trabalho;

Aos professores da Coordenação de Engenharia Ambiental, assim como de outras coordenações, pela boa vontade e ensinamentos transmitidos;

Aos técnicos do Laboratório de Química, Kassia Ayumi Segawa Amaral e ao Marcelo Nunes de Jesus pela disponibilidade, paciência e auxílio no laboratório;

Às companheiras de laboratório Natália Martelozo Santos e Thalita Delduque e em especial à Thaís Luana Grzegozeski pela colaboração;

À Thays Raphaela Gonçalves pela contribuição na análise do peróxido de hidrogênio e que abdicou de suas férias para me ajudar;

Ao senhor Benedito Uczai e sua esposa Salete Uczai, membros da Associação dos Meliponicultores de Mandirituba - AMAMEL, ao Carlos Alexandre Demeterco, zootecnista da Sociedade Protetora da Vida Selvagem – SPVS e Associação de Criadores de Abelhas Nativas da APA de Guaraqueçaba - ACRIAPA, ao Professor Doutor Vagner de Alencar Arnaut de Toledo da Universidade Estadual de Maringá – UEM, a Cooperativa Agrofamiliar Solidária dos Apicultores da Costa Oeste do Paraná – COOFAMEL e ao senhor Davi Davery, que reuniram esforços e disponibilizaram amostras de mel de jataí para a realização deste trabalho;

À Sara Belini de Gois, amiga de longa data e que pude conviver diariamente, tornando essa jornada mais divertida sobretudo nos momentos difíceis, à Mariana Gato Stachissini, que tive o privilégio de conhecer em nosso breve período na Universidade Estadual de Maringá e que depois na Universidade Tecnológica Federal do Paraná pudemos fortalecer essa amizade, à Mônica Carminati Scariotto pela amizade, companheirismo e colaboração, principalmente nos últimos períodos da graduação;

Aos amigos de Maringá que mesmo distantes contribuíram com palavras de incentivo;

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Campo Mourão, que forneceu estrutura física para que este trabalho fosse realizado e a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo incentivo à pesquisa e bolsa concedida.

Finalmente, à minha família pelo apoio, em especial aos meus pais, Eduardo Koiti Umada e Edna Nakagawa Umada, pela confiança, dedicação, apoio e que inúmeras vezes me confortaram com sábias palavras em momentos de angústias. Espero um dia poder retribuir por tudo que fizeram e fazem por mim.

*“Os sonhos não determinam o lugar em que
você vai estar, mas produzem a força
necessária para tirá-lo do lugar em que
está.”*

Augusto Cury

RESUMO

UMADA, Murilo K. **Potencial antimicrobiano correlacionado as características físico-químicas de amostras do mel de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) produzido no Estado do Paraná.** 2014. 88 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

O mel de abelhas é um produto biológico com a matriz química complexa e que possui propriedades antibacterianas, tendo sua composição variando em função da origem botânica, da espécie da abelha produtora e das condições climáticas da região onde foi produzido. As bactérias tem desenvolvido resistência a diferentes antibióticos, estimulando pesquisas com o mel. Contudo estudos sobre as propriedades antimicrobianas de amostras do mel no Brasil ainda são escassas. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do mel de *Tetragonisca angustula*, através da caracterização dos parâmetros físico-químicos e da quantificação do teor de peróxido de hidrogênio e verificando a correlação destes sobre a atividade antimicrobiana. Para tanto foram avaliadas dez amostras de mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Os halos de inibição em diferentes períodos foram comparados com valor da zona de inibição de antibiótico padrão. Pelo teste de Shapiro-Wilk apenas uma amostra não apresentou normalidade do halo de inibição, sendo o resultado das zonas de inibição submetido à análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis e teste *a posteriori* de Dunnett. Os resultados dos parâmetros físico-químicos foram analisados pelo teste H e *a posteriori* de Dunnett. Foi empregado o coeficiente de correlação Pearson para a verificação da relação dos parâmetros físico-químicos e do peróxido de hidrogênio sobre a atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos mostraram atividade antimicrobiana do mel de *T. angustula* e que esta atividade biológica não possui correlação aos parâmetros analisados e do peróxido de hidrogênio, evidenciando que outros fatores estejam envolvidos no potencial antimicrobiano. A bactéria *S. aureus* mostrou-se sensível a duas amostras de mel no período de seis horas e resistência após nove horas de incubação. Após dezoito horas de incubação, apenas o antibiótico amoxicilina apresentou halo de inibição. As amostras apresentaram a variação da umidade em função dos diferentes locais onde foram produzidos e a não conformidade em relação à legislação atual referente ao mel de *Apis mellifera*.

Palavras-chave: Meliponíneos. Qualidade do mel. Abelha nativa. Peróxido de hidrogênio. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

UMADA, Murilo K. **Antimicrobial potential correlated the physicochemical properties of honey samples *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) produced in Paraná State.** 2014. 88 p. Course Completion Assignment (Bachelor of Environmental Engineer) – Federal University of Technology - Paraná. Campo Mourão, 2014.

The honey bee is a biological product with a complex chemical matrix and has antibacterial properties, and its composition varies depending on the botanical origin, the species of bee production and climatic conditions of the region where it was produced. Bacteria have developed resistance to different antibiotics, stimulating research with honey. However studies on the antimicrobial properties of honey samples in Brazil are still scarce. This study aimed to evaluate the antimicrobial potential of honey *Tetragonisca angustula*, through the characterization of the physicochemical parameters and the quantification of the levels of hydrogen peroxide and checking the correlation of these on antimicrobial activity. For that ten samples of honey *T. angustula* Paraná State against the bacterium *Staphylococcus aureus* were evaluated. The inhibition at different periods were compared with the value of the standard antibiotic inhibition zone. The Shapiro - Wilk test only one sample showed no inhibition zone of normality, with the result of the inhibition zones subjected to analysis of variance nonparametric Kruskal - Wallis test and Dunnett's. The results of physicochemical parameters were analyzed by H test and Dunnett's. The Pearson correlation to check the relationship of physicochemical parameters and hydrogen peroxide on the antimicrobial activity was employed. The results showed antimicrobial activity of honey *T. angustula* and that this biological activity has no correlation to the parameters analyzed and hydrogen peroxide, indicating that other factors are involved in antimicrobial potential. The *S. aureus* was sensitive to two honey samples within six hours and strength after nine hours of incubation. After eighteen hours of incubation, only the antibiotic amoxicillin showed inhibition. Samples showed the humidity variation due to different locations where they were produced and non-compliance with the current Brazilian legislation of honey from *Apis mellifera*.

Keywords: Stingless bees. Honey quality. Brazilian native bee. Hydrogen peroxide. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto da abelha <i>Apis mellifera</i>	21
Figura 2 - Aspecto da abelha sem ferrão <i>T. angustula</i> sobre tubo do ninho.	23
Figura 3 - Aspecto do tubo de cerume e abelhas de <i>T. angustula</i>	24
Figura 4 - Aspecto das abelhas-guardas de <i>T. angustula</i> no tubo de cerume.....	25
Figura 5 - Halos de inibição formados com amostras de mel de abelhas <i>T. angustula</i> do Estado do Paraná (PR) pela metodologia de disco-difusão, identificadas com as siglas do município de procedência frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> , demonstrando o nível do potencial antibacteriano após 6 horas de incubação. CA: Controle positivo com antibiótico Amoxicilina (AMO); C: Controle negativo com água destilada.	46
Figura 6 - Halos de inibição formados com amostras de mel de abelhas <i>T. angustula</i> do Estado do Paraná (PR) pela metodologia de disco-difusão, identificadas com as siglas do município de procedência frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> , demonstrando o nível do potencial antibacteriano após 9 horas de incubação. CA: Controle positivo com antibiótico amoxicilina (AMO); C: Controle negativo com água destilada.	48

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Valores de média, máximo e mínimo em milímetro dos halos de inibição obtidos no teste de sensibilidade a antibiótico – TSA pela metodologia de disco-difusão com amostras de mel de abelha jataí (*T. angustula*) do Estado do Paraná após 6 horas de incubação [(p) Kruskal-Wallis = 0,9414; H=3,4957].47
- Gráfico 2 - Valores de média, máximo e mínimo em milímetro dos halos de inibição obtidos no teste de sensibilidade a antibiótico – TSA pela metodologia de disco-difusão com amostras de mel de abelha jataí (*T. angustula*) do Estado do Paraná após 9 horas de incubação..... 49
- Gráfico 3 - Valores dos halos de inibição obtidos da amostragem do mel de *T. angustula* e valores dos controle positivo(AMO) e controle negativo para o período de 6, 9 e 18 horas pelo teste de sensibilidade a antibiótico – TSA. Linha de tendência da atividade antimicrobiana do controle positivo (AMO) [$y=118,88 x^{-1,037}$; $R^2 = 0,9992$]..... 50
- Gráfico 4 - Valores de acidez (meq.kg⁻¹) das amostras analisadas do mel de *T. angustula* produzido no estado do Paraná, coletadas entre setembro/2012 e julho/2013.....54
- Gráfico 5 - Valores do pH obtido das amostras analisadas do mel de *T. angustula* produzido no estado do Paraná, coletadas entre setembro/2012 e julho/2013.55
- Gráfico 6 - Valores de hidroximetilfurfural (mg.kg⁻¹) registrado das amostras analisadas do mel de *T. angustula* produzido no estado do Paraná, coletadas entre setembro/2012 e julho/2013..... 57
- Gráfico 7 - Percentual de umidade obtidos através do método gravimétrico das amostras do mel de *T. angustula* produzidas no Estado do Paraná coletadas entre setembro/2012 e julho/2013..... 58
- Gráfico 8 - Diagrama de dispersão da correlação de Pearson entre acidez e halos de inibição (mm) do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra bactéria Gram-positiva *S. aureus*; [(r) Pearson = - 0,0177; (p) = 0,8638]..... 61
- Gráfico 9 - Diagrama da dispersão da correlação de Pearson entre pH e halos de inibição (mm) do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra bactéria Gram-positiva *S. aureus*; [r (Pearson) = 0,0526; (p) = 0,6221].62
- Gráfico 10 - Dispersão da correlação de Pearson entre hidroximetilfurfural e halos de inibição (mm) do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra bactéria Gram-positiva *S. aureus*; [r (Pearson) = 0,0927; (p) = 0,3850].63
- Gráfico 11 - Dispersão da correlação de Pearson entre hidroximetilfurfural e acidez do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná. [r(Pearson) = - 0,1626; (p) = 0,6536].64
- Gráfico 12 - Dispersão da correlação de Pearson entre hidroximetilfurfural e pH do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná. [r(Pearson) = - 0,1186; (p) = 0,7442]. 65
- Gráfico 13 - Dispersão da correlação de Pearson entre hidroximetilfurfural e umidade do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná. [r(Pearson) = - 0,1798; (p) = 0,6192].65
- Gráfico 14 - Diagrama da dispersão da correlação de Pearson entre umidade halos de inibição do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra bactéria Gram-positiva *S. aureus*; [r(Pearson) = 0,0562; (p) = 0,5985].67
- Gráfico 15 - Diagrama da dispersão da correlação de Pearson entre acidez e umidade do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná; [r(Pearson) = - 0,05789; (p) < 0,05]. 68
- Gráfico 16 - Diagrama da dispersão da correlação de Pearson entre pH e umidade do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná; [r(Pearson) = - 0,0727; (p) = 0,4961].68
- Gráfico 17 - Concentração do peróxido de hidrogênio do mel de *T. angustula*..... 69

Gráfico 18 - Diagrama de correlação de Pearson entre o peróxido de hidrogênio e os halos de inibição contra bactéria *S. aureus*; [r(Pearson) = - 0,1676; (p) = 0,1143]. 70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 ABELHA SEM FERRÃO	20
3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO MEL	25
3.2.1 Acidez.....	28
3.2.2 Hidroximetilfurfural (HMF)	28
3.2.3 Potencial hidrogeniônico (pH).....	29
3.2.4 Umidade	29
3.3 PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DO MEL	30
3.5 MICRO-ORGANISMO <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MEL DA ABELHA DE <i>Tetragonisca angustula</i>	35
4.2 MICRO-ORGANISMO UTILIZADO	36
4.2.1 Linhagem bacteriana.....	36
4.2.2 Meio de cultura ágar Mueller-Hinton.....	36
4.2.3 Preparação do inóculo bacteriano e padronização.....	37
4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANO - TSA.....	37
4.3.1 Interpretação da atividade antimicrobiana.....	38
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL DE <i>Tetragonisca angustula</i>	40
4.4.1 Acidez livre e pH.....	40
4.4.2 Hidroximetilfurfural (HMF)	41
4.4.3 Umidade	42
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	43
4.5.1 Preparo da Solução de KM_4O_4 $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$	43
4.5.2 Padronização da Solução de KM_4O_4 $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$	43
4.5.3 Determinação do teor peróxido de hidrogênio nas amostras de mel.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	46
5.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	52
5.2.1 Acidez livre.....	53
5.2.2 pH	54
5.2.3 Hidroximetilfurfural	56
5.2.4 Umidade	58
5.3 ANÁLISE DO NÍVEL DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL A PARTIR DAS VARIAÇÕES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	59
5.3.1 Acidez e pH.....	60
5.3.2 Hidroximetilfurfural	63
5.3.3 Umidade	66

5.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	69
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE	87

1 INTRODUÇÃO

A sociedade tem buscado alternativas alimentares mais saudáveis, em função disso têm crescido o consumo por produtos orgânicos, dentre estes estão os produtos decorrentes das abelhas (ANDRADE-RODRIGUES et al., 2008). O mel é o produto biológico elaborado pelas abelhas a partir do néctar e transformadas por evaporação da água e da adição de enzimas (SODRÉ et al., 2007). Considerado um alimento de alta qualidade e de alto valor nutritivo devido a sua composição físico-química (ALMEIDA-FILHO et al., 2011; BAZONI, 2012), sendo também atribuídos propriedades antibacteriana do mel (WHITE; SUBERS, 1963; ALLEN; MOLAN e REID, 1991; CORTOPASSI-LAURINO; GELLY, 1991).

O mel é o produto das abelhas melífera mais fácil de ser explorada, apresentando maior possibilidade de comercialização (SILVA et al., 2006). Anacleto (2007) ressalta que a criação de abelhas são atividades conservadoras das espécies, sendo das poucas atividades agropecuárias que apresentam os requisitos da tríplice da sustentabilidade (econômico, social e ambiental), pois gera renda ao produtor rural, gerando ocupação a mão de obra familiar do campo evitando o êxodo rural e conservando o habitat para a criação das abelhas. Segundo Chiari et al. (2002), a criação racional das abelhas sem ferrão para exploração do mel é econômica e ecológica, devido ao baixo investimento e, ao mesmo tempo, possibilitando a reprodução de espécies vegetais através da polinização. Conforme Souza (2008) o mel das abelhas sem ferrão é um produto diferenciado devido ao seu sabor, cor e aroma, obtendo preços mais elevados quando comparado ao mel das abelhas do gênero *Apis*.

O Brasil possui um representativo potencial produtivo de mel, devido a sua diversificada flora, extensão territorial e variabilidade climática (OLIVEIRA; REGINATTO, 2004). Contudo a composição físico-química e a qualidade do mel variam com relação à espécie vegetal visitada, da abelha produtora e com menor influência condições de solo e clima da região. (RACOWNSKI et al., 2007). Proporcionando uma grande variação nas características físico-químicas e de qualidade no mel das abelhas brasileiras (OLIVEIRA; REGINATTO 2004).

A regulamentação do mel para fins de comercialização no Brasil é feito pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000). Porém esta regulamentação, baseada em legislações

internacionais somente atende às características do mel de *Apis mellifera*, não contemplando o mel das abelhas nativas do país (ANACLETO et al., 2009).

Mel de meliponíneos, em geral, possuem percentuais de umidade acima dos valores máximos sugeridos para o mel de *Apis*, desta forma os criadores de abelhas nativas com o intuito de enquadrá-los conforme o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel” utilizam do aquecimento como forma de desumidificar o mel, descaracterizando e alterando características físico-químicas, cuja interação destes é responsável pela atividade antimicrobiana. Desta forma estudos dos parâmetros físico-químicos e das propriedades antimicrobianas do mel das abelhas nativas se tornam importantes com a finalidade de contribuir para a elaboração de uma norma específica para este produto biológico e seu uso como antibiótico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano e caracterizar parâmetros físico-químicos do mel de *Tetragonisca angustula* produzido no Estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a presença e a variação da atividade antimicrobiana *in vitro* do mel de *Tetragonisca angustula* frente à bactéria Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* pelo método de disco-difusão;

Caracterizar parâmetros físico-químicos do mel de *Tetragonisca angustula*: Acidez, Umidade, Hidroximetilfurfural (HMF) e Potencial Hidrogeniônico (pH);

Comparar valores dos parâmetros físico-químicos com as normas vigentes;

Quantificar o teor de peróxido de hidrogênio das amostras de mel de *Tetragonisca angustula* por permanganimetria;

Investigar a correlação dos parâmetros físico-químicos analisados e do peróxido de hidrogênio sobre a atividade antimicrobiana do mel de *Tetragonisca angustula*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ABELHA SEM FERRÃO

O conhecimento pelos povos indígenas nas Américas sobre as abelhas sem ferrão ou abelhas nativas e a criação dessas abelhas, é muito antigo quando comparado, no continente Sul Americano, com as atividades das abelhas *Apis mellifera* (VILLAS-BÔAS, 2012). Até o século XIX no Brasil, a única fonte de mel eram as abelhas sem ferrão (Apidea: Meliponinae) (SILVEIRA; MELO e ALMEIDA, 2002). O mel das abelhas nativas, utilizado na alimentação, era tido como a principal fonte de açúcar do homem, utilizando-o como adoçante natural (KERR et al., 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012). Conforme Kerr et al. (2005), até 1838 as abelhas sem ferrão foram as únicas espécies produtoras de mel empregadas antes da introdução da abelha *Apis mellifera* ou da exploração da cana para fabricação de açúcar.

A herança indígena do conhecimento tradicional foi gradativamente assimilada pelas sociedades pós-colonização (VILLAS-BÔAS, 2012). Esta diversidade de saberes e práticas indígenas podem ser evidenciadas no atual manejo com as abelhas nativas pelos nomes populares de muitas espécies como jataí (*Tetragonisca angustula*), urucu (*Melipona scutellaris*), irapuá (*Trigona spinipes*), jandaíra (*Melipona subnitida*), manduri (*Melipona marginata*) e tantas outras (VILLAS-BÔAS, 2012). Entretanto os nomes populares muitas vezes não indicam com precisão a verdadeira identidade da abelha (NOGUEIRA-NETO, 1997).

De acordo com Ferreira (2012), a apicultura é entendida como a criação de abelhas com ferrão pertencente à superfamília Apoidea do gênero *Apis*, originária da Europa e da África (Figura 1). Para designar manejo das abelhas nativas, o pesquisador Paulo Nogueira Neto utilizou a palavra meliponicultura, que foi utilizada pela primeira vez em 1953 (GEHRKE, 2010). De acordo com Freitas (2003), a meliponicultura é a atividade de criação racional de abelhas sociais (meliponíneos) que possuem o ferrão atrofiado, impossibilitando o seu uso defensivo. Devido à predileção do gênero melípona pelos criadores, o termo persiste mesmo para a atividade onde espécies de outros gêneros de abelhas nativas predominem (GEHRKE, 2010). Apesar de existirem no Brasil cerca de 192 espécies de abelhas nativas ou

abelhas indígenas sem ferrão, pertencentes a diversos gêneros (SILVEIRA; MELO e ALMEIDA, 2002). A abelha *Apis mellifera*, espécie introduzida no período colonial para fins de apicultura, ainda é a mais conhecida entre os brasileiros (SANTOS, 2002).



Figura 1 - Aspecto da abelha *Apis mellifera*.
Fonte: Florit (2014).

Os meliponíneos são abelhas eusociais e que habitam regiões tropicais e subtropicais (NOGUEIRA-NETO, 1997). Sendo o Brasil um dos principais locais de ocorrência dessas abelhas (KERR et al., 1996). Ramalho (2004) ressalta que os meliponíneos destacam-se pelo hábito alimentar generalista, constituindo os principais polinizadores da flora nativa. Kerr (1996), afirma que de acordo com o ecossistema, as abelhas sem ferrão são responsáveis por 40% a 90% da polinização das espécies silvestres de ambientes tropicais.

Venturieri, Raiol e Pereira (2003), ressaltam que a criação racional das abelhas sem ferrão pode ser integrada aos plantios florestais, frutíferas e culturas de ciclo curto, podendo contribuir, através da polinização com o aumento da produção agrícola, originando frutos maiores e em maior quantidade e regeneração da vegetação nativa. Os mesmos autores

destacam que a meliponicultura auxilia na geração de renda e emprego, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida do meliponicultor ou produtor familiar. Desta forma a meliponicultura demonstra ser uma ferramenta no processo de re/construção de consciência ambiental, pois alia a criação e perpetuação de abelhas nativas e o manejo de seus produtos, com a conservação do ambiente (KURIHARA; CARDOSO, 2007).

Dentre as abelhas nativas sem ferrão com ampla distribuição geográfica na região neotropical, estão às abelhas *Tetragonisca angustula* (CAMARGO; PEDRO, 2007) (Figura 2). A *Tetragonisca angustula*, conhecida pelo nome vulgar jataí (NOGUEIRA-NETO, 1997), é uma espécie da subfamília Meliponinae inserida na tribo Trigonini (MOURE, 1961) que são encontrados desde a Argentina até o México (BAITALA, 2005), com ocorrência nos Estados do Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (ROUBIK, 1983; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 1984; NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA; MELO e ALMEIDA, 2002; SOUZA et al., 2009), exceto na caatinga brasileira e algumas regiões da Amazônia (OLIVEIRA et al., 2004). Nogueira-Neto (1997) ressalta que a abelha jataí não apresenta risco em eliminar espécies nativas quando introduzida em igual nicho ecológico, pois a abelha jataí possui nicho ecológico peculiar convivendo com meliponíneos e abelhas de outros grupos, incluindo *Apis mellifera*.



**Figura 2 – Aspecto da abelha sem ferrão *T. angustula* sobre tubo do ninho.
Fonte: Florit (2014).**

Malagodi-Braga e Kleinert (2004) destacam que a espécie *Tetragonisca angustula* é amplamente utilizada na meliponicultura, devido o seu comportamento não agressivo. Além de nidificar em cavidades de troncos vivos ou mortos, em fissuras de paredes, no chão e em tubulações, adaptando-se às diferentes condições de nidificações, ocorrendo também em áreas antrópica (CASTANHEIRA, 1995; NOGUEIRA-NETO, 1997; FREITAS; SOARES, 2004). A arquitetura do ninho de jataí possui características peculiares, caracterizada por um tubo de cerume marrom-amarelado com a extremidade com bordas mais estreitas de cera mais clara (FREITAS e SOARES, 2004) (Figura 3). A entrada do ninho para a maioria dos meliponíneos é guardada por abelhas que defendem a colmeia contra ataque ou invasão de abelhas de outras colmeias e formigas (Figura 4). Zeil e Wittmann (1989), estudando o comportamento de voo das abelhas-guardas de *T. angustula* verificaram que estas mantinham sua posição por até 70 minutos frente à colmeia.



Figura 3 - Aspecto do tubo de cerume e abelhas de *T. angustula*.
Fonte: Florit (2014).

Nogueira-Neto (1997) ressalta qualidades da abelha jataí como rusticidade e hábitos higiênicos, dispensando a pasteurização do mel. Através de análise polínica de amostras do mel de colônias mantidas no câmpus da USP, Imperatriz-Fonseca et al. (1984), concluíram que as abelhas de *T. angustula* visitaram 180 espécies vegetais pertencentes a 45 famílias distintas para coleta de alimento. Ramalho et al. (1994) notaram que as abelhas campeiras de jataí mostraram alta fidelidade (97%) a um mesmo tipo de floral, não misturando pólen de diferentes fontes florais sendo eficiente para fins de polinização. Os mesmos autores relatam uma maior capacidade em transportar cargas de pólen do que espécie de outros meliponíneos (*Melipina quadrifasciata* e *Melipona scutellaris*) em relação ao peso do seu próprio corpo. De acordo com Malagodi-Braga e Kleinert (2004), a abelha jataí mostrou-se eficiente na polinização de cultura de morango em estufas, encontrando diferença significativa entre as flores polinizadas que produziram frutos mais pesados, em maior quantidade e com o desenvolvimento perfeito em relação às flores não polinizadas.

De acordo com Freitas e Soares (2004), dentre os trigoníneos, a jataí produz mel com o sabor mais apreciado e peculiar. Segundo Bertoldi (2008), nos últimos anos tem aumentado significativamente o consumo de mel no mundo, em decorrência da mudança dos hábitos alimentares em consumir produtos naturais. Mendes et al. (2009) afirmam que o mel de abelhas nativas é um produto que tem apresentado uma demanda crescente de mercado, quando comercializados obtendo preços mais altos em relação ao mel de *A. mellifera*, devido ao seu sabor e propriedades terapêuticas a ele atribuídas.



Figura 4 – Aspecto das abelhas-guardas de *T. angustula* no tubo de cerume.
Fonte: Florit (2014).

3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO MEL

O mel é o produto biológico com matriz quimicamente complexa produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores, das secreções de partes vivas das plantas ou, ainda, das excreções em forma de líquidos açucarados de homópteros (BRASIL, 2000; CAMPOS et al.,

2003). Sendo um alimento altamente nutritivo devido à sua composição química (BAZONI, 2012).

De acordo com a Instrução Normativa nº11 (BRASIL, 2000), o mel é uma solução concentrada de açúcares e contém, ainda, uma mistura complexa de outros hidratos de carbonos, enzimas, aminoácidos ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen, podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração. A presença e a quantidade das substâncias presentes no mel definem suas características físico-químicas (BATISTA DE SOUSA, 2011). O percentual dessas substâncias presentes no mel podem variar a depender da abelha produtora, origem da matéria-prima, da região geográfica, do clima, estado fisiológico da colônia, o estágio de maturação do mel, manejo das colônias e o armazenamento (WHITE, 1978; CRANE, 1987; ANKLAM, 1998; SODRÉ, 2000).

A formação do mel ocorre em duas modificações principais no néctar (PAULINO; MARUCCI, 2009). De acordo com Garcia-Cruz et al. (1999), a elaboração do mel inicia-se logo após a colheita do néctar e do orvalho doce na vesícula melífera das abelhas operárias forrageadoras. Nesta etapa enzimas das glândulas hipofaríngeas das abelhas são adicionadas ao néctar durante a coleta (BAZONI, 2012).

Na colmeia, as abelhas campeiras regurgitam o néctar coletado transferindo-o para as operárias que recebem o material bruto e o processam (GARCIA-CRUZ et al., 1999; BAZONI, 2012). Nesta etapa física, ocorre a desidratação do néctar na absorção no papo da abelha (PAULINO; MARUCCI, 2009). Garcia-Cruz et al. (1999) ressalta que a desidratação feita sobre a língua da abelha operária diminui o conteúdo de água em 40% a 50% do peso inicial do néctar. Então o néctar é colocado em alvéolos para a desidratação adicional através da ventilação reduzindo o teor de água (BAZONI, 2012). Quando a atividade enzimática e a desidratação da água estão completas, os alvéolos são fechados com uma película de cera e o mel é deixado para maturar (GARCIA-CRUZ et al., 1999; BAZONI, 2012).

O mel após o processo de maturação apresenta em sua composição básica 70% de açúcares, em maior proporção os glicídios, frutose e glicose sendo as substâncias mais significativas no mel em proporções quase iguais (KERR, 1996). A água é o segundo componente em maior quantidade presente no mel (BATISTA DE SOUSA, 2011). Outras substâncias também são descritas no mel, como sais minerais (potássio, sódio, cálcio, magnésio, zinco, manganês, cobre) (BERTOLDI et al., 2007); ácidos (acético, benzóico, butírico, cítrico, fenilacético, fórmico, glucônico, isovalérico, láctico, maléico, málico,

oxálico, piroglutâmico, succínico e valérico) (CRANE, 1983; MARCHINI; SODRÉ e MORETI, 2004); vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, vitamina K, ácido fólico, biotina, piridoxina) (BAZONI, 2012); substâncias aromáticas, pigmentos, cera e grãos de pólen (ANANIAS, 2010), enzimas (α -glicosidases; α - e β -amilases; glicose-oxidase; catalase e fosfatase ácida) (GARCIA-CRUZ et al., 1999; BAZONI, 2012); flavonóides e outras substâncias biologicamente ativas (HOOPER, 1981), e uma extensa variedade de compostos orgânicos que contribuem para sua cor, odor e sabor (VILHENA; ALMEIDA-MURADIAN, 1999).

O Brasil apresenta grande diversidade, devido a ampla extensão territorial e variabilidade climática além de apresenta uma grande variedade de espécies de abelhas (PIANARO, 2007). White (1978) ressalta que a composição do mel depende basicamente da composição do néctar da origem da flora visitada e da espécie de abelha que o produz conferindo-lhes características específicas. Outros fatores como as condições climáticas e do solo da região de onde o mel é produzido, podem alterar com menor influência as características físico-químicas do mel (KOMATSU, MARCHINI e MORETI, 2002; SODRÉ et al., 2003). Desta forma características que tornam o Brasil um país interessante para produção de mel também proporcionam uma grande variação nas características físico-químicas e de qualidade (OLIVEIRA; REGINATTO 2004).

Almeida-Anacleto (2007) afirma que as características físico-químicas, microbiológicas e polínicas do mel produzido pelas abelhas nativas do Brasil são pouco conhecidas. Este fato é devido à elevada diversidade da flora apícola principalmente nas regiões tropicais, associadas às elevadas taxas de umidade e temperatura atrelada à baixa produção que é inerente a estas espécies (SODRÉ, 2000; ALMEIDA-ANACLETO, 2007).

A regulamentação do mel no Brasil para fins de comercialização é feito pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, como referências as normas do *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 1990) e da Resolução GMC nº 89/99 (MERCOSUL, 1999), entretanto a legislação brasileira somente atende às características do mel de *Apis mellifera*, não contemplando o mel das abelhas nativas do país (ALMEIDA-ANACLETO et al., 2009).

Trabalhos de análises físico-químicas do mel são realizados com o objetivo de comparar os resultados obtidos com padrões estabelecidos para o mel de *Apis mellifera* pelas agências reguladoras nacionais ou internacionais, para a verificação da qualidade do mel produzido internamente, assim como para a fiscalização com relação a adulterações que podem ocorrer (CARVALHO et al., 2005).

A legislação brasileira recomenda a análise de nove caracteres (BRASIL, 2000). Carvalho et al. (2005), destaca que outros critérios podem ser utilizados no sentido de fornecer informações que possam colaborar no conhecimento deste produto. Os parâmetros físico-químicos estudados no presente trabalho serão:

3.2.1 Acidez

A acidez do mel deve-se a diversos fatores como a variação dos ácidos orgânicos causadas pelas diversas fontes de néctar, a atividade enzimática da glicose-oxidase que origina o ácido glucônico (MENDES et al., 2009). O ácido glucônico é o ácido que apresenta maior porcentagem sobre outros ácidos. Este ácido é resultado da ação enzimática da glicose-oxidase sobre a glicose originando o ácido glucônico estando em equilíbrio com a glicolactona (CRANE, 1983; WHITE, 1978).

A acidez livre é um parâmetro importante na qualidade do mel, uma vez que contribui para o sabor característico deste alimento (CRANE, 1987). Os ácidos do mel dissolvidos em solução aquosa produzem íons de hidrogênio, promovendo a sua acidez ativa, sendo possível indicar as condições de armazenamento e o processo de fermentação (MARCHINI et al., 2004). Os ácidos do mel que contribuem para a sua resistência a danos causados por micro-organismos (RACOWSKI et al., 2007; ALMEIDA-ANACLETO, 2007).

3.2.2 Hidroximetilfurfural (HMF)

O hidroximetilfurfural (HMF) é um derivado químico dos açúcares. É o resultado da hidrólise ácida de açúcares simples (glicose e frutose) na presença de ácido glucônico e dos ácidos do mel (ANANIAS, 2010).

A presença do HMF é utilizado como indicador de qualidade (CARVALHO et al., 2005). Salinas; Esoinosa-Mansilla e Berzas-Nevado (1991) ressaltam que este composto além de um indicador de superaquecimento, pode indicar a idade do mel, adição açúcar invertido.

3.2.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH determinado no mel refere-se aos íons hidrogênio presentes na solução (VIDAL; FRIGOSSO, 1984). A variação do pH pode ser influenciada pelo pH do néctar, solo ou associações de vegetais para a composição do mel (CRANE, 1987). De acordo com Almeida-Anacleto (2007), o pH do mel pode variar pela concentração de diferentes ácidos, minerais (cálcio, potássio e sódio) e outros constituintes das cinzas. Souza (2008), ressalta que o pH é considerado um importante fator antimicrobiano, promovendo estabilidade ao produto frente ao desenvolvimento de micro-organismos.

A análise do parâmetro pH pela atual legislação brasileira de controle de qualidade do mel não é obrigatório, entretanto possui grande importância no auxílio desta análise por influenciar na velocidade de formação do hidroximetilfurfural (SILVA; QUEIROZ e FIGUEIREDO, 2004; MENDES et al., 2009).

3.2.4 Umidade

A umidade é o segundo componente de maior porcentagem presente no mel (PERALTA, 2010). O conteúdo de água tem influência direta na viscosidade, cor, peso específico, maturidade, cristalização, conservação e palatabilidade (CRANE, 1983; WHITE, 1978; ESTUPIÑÁN et al., 1998).

Conforme Mendes et al. (2009), a diferença da umidade entre meliponíneos e *Apis mellifera* pode ser devido ao manejo da abelha em opercular o mel, visto que, de maneira geral a abelha *Apis* opercula o mel quando este apresenta umidade em torno de 17% a 18% de umidade, diferenciando-se da abelha nativa, a qual opercula o potes de mel com umidade variando em torno de 24%.

Micro-organismos osmofílicos presentes nos corpos das abelhas, no néctar, no solo e nas áreas de extração e armazenamento do mel (WHITE, 1978) quando presentes no mel multiplicam-se com o aumento da umidade, favorecendo o processo de fermentação (CARVALHO et al., 2005).

3.3 PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DO MEL

De acordo com Bazoni (2012), as propriedades antibacterianas do mel foram reconhecidas *in vivo* por Aristóteles (350 a.C.). Conforme Dustmann (1979) o efeito bactericida foi reconhecida por Van Ketel em 1892. A primeira menção à presença de antibióticos em mel de meliponíneos foi realizada por Gonnet, Lavie e Nogueira-Neto em 1964 (NOGUEIRA-NETO, 1997). Molan (2001); Améndola (2003) relatam que o mel tem sido usado como antimicrobiano antes mesmo da descoberta que as bactérias fossem responsáveis por infecções.

White; Subers e Schepartz (1963); Vargas (2006); Bazoni (2012) ressaltam, que as mesmas propriedades desenvolvidas pelas abelhas sociais para preservação do mel contra micro-organismos funcionam na aplicação medicinal como antibiótico. Iurlina et al. (2009) destaca que a atividade individual e sinergia das características físico-químicas desempenha um papel no caráter antimicrobiano. Para White (1979); Hooper (1981); Molan (1992) e Wahdan (1998), os responsáveis pela habilidade antimicrobiana são os fatores físicos, alta pressão osmótica e acidez, e os fatores químicos como a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio. Posteriormente foram descobertas substâncias voláteis, fatores antimicrobianos não peróxidos, incluindo ácidos fenólicos e flavonóides como agentes antimicrobianos (WESTON, 2000).

Diversos trabalhos confirmaram um amplo espectro de ação antimicrobiana do mel capaz de inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (WHITE; SUBERS; SCHEPARTZ, 1963; DUSTMANN, 1979; ALLEN, MOLAN; REID, 1991; CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991; MOLAN, 1992). Molan (1992) observou que o mel mostrou-se eficaz contra bactérias resistentes a antibióticos como *Staphylococcus aureus*, resistente à metilicina (MRSA), e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, principais agentes infecciosos de feridas e queimaduras respectivamente.

Vargas (2006) estudando 80 amostras de mel dos Campos Gerais do Estado do Paraná, observou atividade antimicrobiana frente *Escherichia coli* e mais expressivamente contra *Staphylococcus aureus*. Miorin et al. (2003) compararam a atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* de amostras de mel de *A. mellifera* e de abelha sem ferrão *T. angustula* provenientes dos Estados de Minas Gerais e Paraná, não encontrando diferença significativa entre o mel produzido por essas espécies; Peralta (2010) estudando mel das mesmas espécies

do Estado da Bahia observou para a amostragem analisada uma maior atividade antimicrobiana do mel de *A. mellifera* em comparação ao mel de abelha sem ferrão. Gonnet; Lavie e Nogueira-Neto (1964); Cortopassi-Laurino e Gelli (1991); Martins et al. (1997), estudaram o potencial antibacteriano do mel de abelhas africanizadas e de abelhas sem ferrão brasileiras, observaram que a atividade média antibacteriana das amostras de *A. mellifera* foi claramente inferior aos resultados obtidos aos das abelhas nativas. Ainda no estudo de Martins et al. (1997), os autores observaram que as amostras de mel das abelhas da tribo Trigonini foram agentes antimicrobianos superiores ao da tribo Meliponini.

White; Subers e Schepartz (1963) afirmam que peróxido de hidrogênio é a principal substância responsável pela atividade antibacteriana do mel. Weston (2000) destaca que a quantidade de peróxido de hidrogênio depende tanto dos níveis de glicose-oxidase, quanto de catalase. A enzima catalase presente no mel se origina do pólen e do néctar da flor (MOLAN, 1992), e sua quantidade depende da origem floral e da quantidade de pólen coletado pelas abelhas (WESTON, 2000). Castro (2004) ressalta que quando presente, a catalase é inversamente proporcional a quantidade de peróxido de hidrogênio existente no mel. Entretanto, Kleinert et al. (2009), afirma que mesmo quando a produção de peróxido de hidrogênio é inibida com a adição de catalase, ainda assim, o mel dos meliponíneos mantém atividade antibacteriana. Nogueira-Neto (1997) afirma que além da catalase, existe outros fatores que podem contribuir para eliminar ou diminuir a quantidade de peróxido de hidrogênio presente no mel, como grãos de pólen. De acordo com White; Subers e Schepartz (1963), o processamento e estocagem podem influir na queda do teor de peróxido de hidrogênio

Weston (2000) observou a ação antibacteriana do peróxido de hidrogênio e dos compostos fenólicos no mel, concluindo que os flavonóides eram derivados da própolis e apresentaram baixa atividade antimicrobiana. Molan (2001), concluiu que os compostos fenólicos (ácido benzóico, cinâmico e flavonóides), contribuíram de forma inferior se comparado à atividade antimicrobiana do peróxido de hidrogênio no mel. De acordo com Peralta (2010), a reação do peróxido de hidrogênio e o ácido benzóico pode criar peroxiácidos, estes mais estáveis que o peróxido de hidrogênio, ainda de acordo com o autor referido, os peroxiácidos em pH ácido são agentes antimicrobiano mais eficientes que o peróxido de hidrogênio escapando da destruição da catalase, devido à seletividade desta enzima, específica para o peróxido de hidrogênio.

Nogueira-Neto (1997) considera que em muitos casos a acidez do mel de meliponíneos impede o crescimento de micro-organismos prejudiciais. A enzima glicose oxidase, que é adicionada pela glândula da abelha, transforma a glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio conferindo ao mel resistência ao ataque bacteriano (BAZONI, 2012). A acidez do mel é predominantemente responsável pelo ácido glucônico, que constitui aproximadamente de 70% a 90% dos ácidos orgânicos presentes no mel (BATISTA DE SOUSA, 2011).

A umidade do mel é um parâmetro que se relaciona com os fatores físicos e químicos responsáveis pela atividade antimicrobiana do mel. Grossi (1998) ressalta que mel que possui maior umidade confere viscosidade mais baixa. Conforme Nogueira-Neto (1997) mel com menor viscosidade faz com que a atividade da enzima glicose oxidase seja mais intensa, havendo maior produção de ácido glucônico, ocasionando pH relativamente baixo e acidez livre alta.

Conforme Nogueira-Neto (1997) outro fator antibacteriano a ser considerado é o pH. Segundo Estupiñán et al. (1998), o pH depende dos ácidos ionizados do mel, assim como dos elementos minerais e influencia na atividade enzimática e entre outras propriedades. White; Subers e Schepartz (1963) destacam que a atividade enzimática da glicose-oxidase abaixa o pH do mel, paralisando a atividade da própria enzima cessando a produção do peróxido de hidrogênio. De acordo com Crane (1983), o valor do pH está relacionado com a particularidade na composição florística dos locais de coleta, uma vez que o pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar.

Molan (2001); Al-Waili (2004), ressaltam que o mel de diferentes fontes florais, processados e estocados de maneiras diferentes apresenta variação em sua atividade antimicrobiana. Conforme Crane (1983); Camargo et al. (2006), o processo que está relacionado ao grau de envelhecimento do mel ou pelo processamento do mel que envolva aumento de temperatura é a formação do hidroximetilfurfural. Para Spano et al. (2006), o HMF é produto da degradação sendo sua concentração influenciada pelo baixo pH, acidez total, minerais e origem botânica, umidade, temperatura e *stress* fotoquímico.

Souza-Freitas et al. (2010) analisando a influência do tratamento térmico no mel de *Melipona subnitida*, constataram o decréscimo dos parâmetros acidez total e umidade e aumento do pH e açúcares redutores, alterando o valor nutricional do mel e indicando a perda de algumas enzimas. Gonnet; Lavie (1960) constataram que mel de *A. mellifera* aquecidos à temperatura de 80°C durante 30 minutos ainda apresentavam valores superiores à metade do

valor antibiótico presentes em amostras de mel frescos. White; Subers e Schepartz (1963) analisando a influência da temperatura no mel constataram redução nos valores de atividade antimicrobiana, além de uma redução no conteúdo de peróxido de hidrogênio no mel aquecido.

3.5 MICRO-ORGANISMO *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* foram descritos pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexander Ogston (SANTOS et al., 2007). O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Microoccae*, possuindo, atualmente 33 espécies, podendo 17 serem isoladas de amostras biológicas humanas (SANTOS et al., 2007). Os *Staphylococcus* são bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivos com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, apresentam-se isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados (CORDEIRO, 2011). A bactéria *Staphylococcus aureus* é a espécie mais virulenta do seu gênero (PERALTA, 2010). As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, com pH de 4,00 a 9,80, sendo a faixa de pH ótimo entre 6,00 e 7,00 (LUZ, 2008). A temperatura de crescimento pode variar de 4°C a 46°C, sendo capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira (SANTOS et al., 2007, CORDEIRO,2011).

A bactéria de *S. aureus* encontra-se amplamente distribuídos no ambiente e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas e até intestino (SANTOS et al., 2007). Frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005). As doenças causadas por *S. aureus* variam desde intoxicações alimentares ou infecções cutâneas de pouca importância até infecções hospitalares graves, principalmente da corrente sanguínea, associando-se significativamente a morbidades e mortes (SPERANÇA, GOMES; PRAZERES, 2010).

Com a descoberta da penicilina em 1928 e seu uso a partir da década de 1940 a grande maioria dos *Staphylococcus aureus* era sensível a este antibiótico (CHAMBERS, 1988). No final da década de 1950, a bactéria da espécie *S. aureus* tinha desenvolvido resistência a grande maioria dos antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina (CHAMBERS, 1988). Com a introdução da penicilina em uso clínico, o *S. aureus* passou a

desenvolver resistência a esse β -lactâmico pela produção da enzima β -lactamase (penicilinas), capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico da penicilina, tornando-a inativa (SANTOS et al., 2007). Com o uso das penicilinas semissintéticas, em 1970 surgiram cepas resistentes a meticilina denominadas MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), na qual o padrão de resistência estende-se a outros antibióticos β -lactâmicos (VOSS et al., 1994). Conforme Santos et al. (2007), as cepas MRSA se disseminaram em ambientes hospitalares, limitando o uso de glicopeptídios vancomicina e teicoplanina ao combate de *S. aureus*. De acordo com Souza, Reis e Pimenta (2005), em 1997 no Japão foram registradas amostras de *Staphylococcus* resistentes ao glicopetídeo denominadas VRSA (*Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus*).

Conforme Tomasz et al. (1989), a bactéria *S. aureus* possui três mecanismos distintos de resistência à meticilina: a) Hiperprodução de β -lactamases; b) Presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP – *Protein Binding Penicilin*) alterada denominada PBP 2a; c) Modificações na capacidade de ligação das PBPs. Além de possuir enzimas como a coagulase, catalase, hialuronidase, fibrinolisinases, lipases, nucleases e penicilinas (SOUZA; REIS e PIMENTA, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação do potencial antimicrobiano e as análises dos parâmetros físico-químicos das amostras de mel de *Tetragonisca angustula*, foram realizadas nos Laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Campo Mourão.

4.1 MEL DA ABELHA DE *Tetragonisca angustula*

Foram avaliadas 10 amostras de mel pasteurizadas e não pasteurizadas de *Tetragonisca angustula*.

As amostras de mel das abelhas foram adquiridas entre junho e agosto de 2013, a partir de meliponicultores ou associações de meliponicultores, sendo de diferentes localidades do Estado do Paraná (PR) (Tabela 1). Essas amostras de cerca de 100 mL, foram mantidas em seus frascos de origem, sendo identificadas conforme o seu local de colheita, armazenadas em geladeira a 6°C e mantidos no escuro para a proteção dos compostos sensíveis a temperatura e a luz até a realização das análises.

Tabela 1 – Município de origem, identificação, data de colheita e tratamento térmico das amostras de mel produzidas por *Tetragonisca angustula* adquiridas no Estado do Paraná (PR)

LOCALIDADE DE ORIGEM DA AMOSTRA (Município – Estado)	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	DATA DE COLHEITA (mês/ano)	Tratamento térmico (Pasteurização)
Campo Mourão – PR	CM	Junho/2013	Não pasteurizado
Céu Azul – PR	CEU	Novembro/2012	Pasteurizado
Guaraqueçaba – PR	GUA	Janeiro/2013	Pasteurizado
Mandirituba – PR	MAN-B	Fevereiro/2013	Pasteurizado
Mandirituba – PR	MAN-M	Fevereiro/2013	Pasteurizado
Maringá – PR	MGA	Julho/2013	Não pasteurizado
Ortigueira – PR	ORT	Junho/2013	Pasteurizado
Santa Helena – PR	SH	Setembro/2012	Pasteurizado
Ubiratã – PR	UBI	Junho/2013	Não pasteurizado
Francisco Beltrão - PR	SC	Janeiro/2013	Pasteurizado

4.2 MICRO-ORGANISMO UTILIZADO

4.2.1 Linhagem bacteriana

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Esta linhagem foi obtida no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, câmpus Campo Mourão e são mantidas sob-refrigeração a temperatura de 6°C em meio de cultivo líquido.

4.2.2 Meio de cultura ágar Mueller-Hinton

A composição do meio de cultura ágar Mueller-Hinton para 1000 mL de água destilada (q.s.p.) contem os seguintes componentes: Infuso de Carne (300,00 g), Hidrolisado de Caseína (17,50 g), Amido (1,50 g), Ágar (17g) e pH $7,30 \pm 0,1$. Para o preparo de meio sólido ágar Mueller-Hinton, o meio de cultura foi pesado sobre papel alumínio em balança analítica tarada, conforme as especificações do rótulo da embalagem (21g/L).

O pó do meio de cultura foi transferido para um Erlenmeyer, sendo vertida sobre o papel alumínio uma pequena quantidade de água destilada para arrastar todo o meio de cultura, completado de água destilada conforme a especificação. O Erlenmeyer com o meio de cultura foi levado para um banho-maria a 60°C durante 20 minutos. A cada 3 minutos, a solução foi homogeneizada para a dissolução do ágar Mueller-Hinton com auxílio de um bastão de vidro. Após a fundição do meio de cultura em banho-maria, na abertura do balão Erlenmeyer foi tampado com gaze e coifa de papel Kraft e autoclavado a 1 atm de pressão e temperatura de 120°C por 15 minutos. Depois de esterilizado, o meio foi levado para banho-maria a 50°C até o momento do plaqueamento.

O procedimento de plaqueamento foi realizado com o meio de cultura ágar Mueller-Hinton na forma líquida, onde cerca de 20 mL era vertido em cada placa de *Petri* de 25 x 100 mm estéril em câmara de fluxo laminar. A placa foi colocada sobre superfície plana, sendo realizados movimentos delicados em forma de “8”.

Após o meio de cultura solidificar, as placas de *Petri* foram embaladas em conjuntos de 3 com filme de PVC e armazenadas em posição invertida em geladeira a temperatura de 6°C até o momento das análises.

4.2.3 Preparação do inóculo bacteriano e padronização

A linhagem bacteriana descrita no item 4.2.1, foi repicada em meio ágar Mueller-Hinton e crescida a temperatura de 35°C em estufa bacteriológica por 24 horas, posteriormente foi feita uma suspensão da linhagem onde as colônias de bactérias foram transferidas em solução salina estéril 0,9% até obtenção de turvação correspondente a escala nefelométrica 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) a qual foi medida em espectrofotômetro com comprimento de densidade óptica (D.O.) de 580 nm e absorbância de 0,08 e 0,10 (KONEMAM et al., 2001).

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANO - TSA

Para o teste de sensibilidade (TSA), o material necessário foi embalado com papel Kraft, esterilizado em autoclave por 15 minutos à temperatura de 120°C e 1 atm, posteriormente era seco em estufa a 100°C.

O isolado bacteriano padronizado (item 4.2.3) foi submetido ao TSA por meio da técnica de difusão em disco de acordo com a metodologia descrita por Bauer et al. (1966).

O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, com um *swab*, a suspensão bacteriana foi semeada sobre toda a superfície do ágar Mueller-Hinton nas placas de *Petri*.

Para cada amostra de mel realizou-se nove repetições para o TSA, na qual em cada placa discos de papel filtro estéril com 5 mm de diâmetro impregnados com cerca de 1 mL de uma amostra de mel, sendo o excesso retirado das superfície dos discos e distribuídos na superfície do ágar contendo a estirpe bacteriana sendo levemente pressionados com auxílio de uma pinça estéril. Para determinar a resistência da linhagem bacteriana foram empregados discos-controle com antibiótico amoxicilina 10 µg (AMO) e com água destilada, sendo

utilizado como controle positivo e controle negativo respectivamente. As placas foram identificadas e incubadas em posição invertida em estufa bacteriológica a 35°C.

As leituras dos halos foram realizadas em 6, 9 e 18 horas após a incubação para verificar o comportamento da bactéria frente às amostras de mel e do controle positivo. Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano foram mensurados em milímetro ao redor de cada disco com auxílio de lupa microbiológica e paquímetro digital.

4.3.1 Interpretação da atividade antimicrobiana

Para a interpretação dos halos de inibição foram consideradas três terminologias: micro-organismo sensível (S), micro-organismo intermediário (I) e micro-organismo resistente (R).

Para a mensuração dos diâmetros dos halos de inibição das categorias sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R) é indicada abaixo. O resultado de inibição a partir do TSA baseou-se nas especificações contidas na Tabela 2.

- a) Sensível (S): O efeito do antibiótico ou agente antimicrobiano testado, após o período de incubação, na placa de *Petri* contendo ágar, é a formação de uma região com halo de inibição (escasso desenvolvimento ou ausência total de colônias na região de incidência da amostra) (CSLI, 2003).
- b) Intermediário (I): Os halos de inibição apresentam valores menores ao padrão interpretativo “sensível” e valores maiores da interpretação “resistente” conforme a tabela utilizada.
- c) Resistente (R): As cepas “resistentes” não são inibidas pelas concentrações sistêmicas dos agentes antimicrobianos (CLSI, 2003).

Tabela 2 – Padrão interpretativo das zonas de inibição (em mm) de antibiograma, baseado na técnica de Bauer et al. (1966).

Antibiótico	Concentração	Sigla	Padrão interpretativo		
			R	I	S
Penicilina	10 un	PEN	≤14	-	≥15
Ampicilina	10 µg	AMP	≤13	14 a 16	≥17
Amoxicilina	10 µg	AMO	≤11	12 a 13	≥14
Amoxicilina + Clavulanato	20/10 µg	AMC	≤13	14 a 17	≥18
Cefalexina	30 µg	CFX	≤14	15 a 17	≥18
Cefalotina	30 µg	CFL	≤14	15 a 17	≥18
Ceftriaxona	30 µg	CRO	≤13	14 a 20	≥21
Cefadroxil	30 µg	CEF	≤14	15 a 17	≥18
Imipeném	10 µg	IPM	≤13	14 a 15	≥16
Lincomicina	2 µg	LIN	≤14	15 a 20	≥21
Sulfa + Trimetoprim	25 µg	SUT	≤10	11 a 15	≥16
Gentomamicina	10 µg	GEN	≤12	13 a 14	≥15
Amicacina	30 µg	AMI	≤14	15 a 16	≥17
Neomicina	30 µg	NEO	≤12	13 a 14	≥15
Eritromicina	15 µg	ERI	≤13	14 a 22	≥23
Tetraciclina	30 µg	TET	≤14	15 a 18	≥19
Doxiciclina	30 µg	DOX	≤14	15 a 18	≥19
Ciprofloxacina	5 µg	CIP	≤15	16 a 20	≥21
Norfloxacina	10 µg	NOR	≤12	13 a 16	≥17
Enrofloxacina	10 µg	ENO	≤12	13 a 16	≥17

R: resistente; I: intermediário; S: sensível.

Fonte: Laborclin – Produtos para laboratórios Ltda. apud Sprea (2005).

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL DE *Tetragonisca angustula*

As análises dos parâmetros físico-químicos acidez livre, hidroximetilfurfural (HMF), pH foram realizadas de acordo com as técnicas descritas pela A.O.A.C. (*Association of Official Analytical Chemists*, 2000). O parâmetro umidade foi realizado de acordo com Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.4.1 Acidez livre e pH

Para a tomada do pH e acidez livre para cada amostra foram pesados 2,00 g de mel e diluídos em água destilada até o volume de 15 mL. Posteriormente o pH foi determinado com auxílio de um pHmetro de bancada Schott Gerate, modelo CG818, previamente calibrado com solução tampão de pH 4,00 e 7,00.

A solução utilizada para determinação do pH foi utilizada na determinação da acidez livre, sendo adicionadas 3 gotas de fenolftaleína 1% e titulando-se com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 M em bureta de 25 mL até o ponto de viragem, onde a solução obtia coloração levemente rósea persistente por 10 segundos.

A acidez foi calculada segundo a fórmula (1):

$$Acidez = \frac{Volume\ gasto\ (mL) \times Molaridade_{(NaOH)} \times Fc_{(NaOH)} \times 1000}{Massa\ de\ amostra\ (g)} \quad (1)$$

quando o peso é exatamente 2,00 g de amostra e NaOH 0,05 M, o cálculo resume-se em (2):

$$Acidez\ (mEq/Kg) = Volume\ gasto\ (mL) \times Fc_{(NaOH)} \times 25 \quad (2)$$

Onde:

$Fc_{(NaOH)}$: fator de correção NaOH (0,05; $fc = 1,0496$).

4.4.2 Hidroximetilfurfural (HMF)

A metodologia utilizada foi para a determinação do Hidroximetilfurfural (HMF) foi o método espectrofotométrico.

As soluções necessárias foram previamente preparadas:

Solução de Carrez I: 15 g de $K_4Fe(CN_6).3H_2O$ diluídos e completados para 100 mL com água destilada;

Solução de Carrez II: 30 g de $Zn(CH_3COO)_2.2 H_2O$ e completados para 100 mL com água destilada.

Solução de bissulfito de sódio 0,2% (m/v).

Em um béquer de 50 mL foram adicionados 5,00 g de mel e 25 mL de água destilada, agitando a solução para a solubilização da amostra. Posteriormente foram adicionados 500 mL de solução Carrez I, homogeneizando, e mais 50 mL da solução de Carrez II, homogeneizando. A solução de mel após ser misturada com a solução de Carrez II se torna turva, sendo completada para o volume de 100 mL. A solução foi filtrada em papel filtro, descartando-se os primeiros 10 mL filtrados.

Foram pipetados 5 mL da solução filtrada e transferidos para 4 tubos de ensaio de 50 mL. No primeiro tubo de ensaio foram adicionados 5 mL da solução de bissulfito de sódio 0,2%, sendo este tubo referência. Nos demais tubos, denominados tubos teste foram adicionados 5 mL de água destilada.

Os tubos de ensaio de referência e teste foram homogeneizados e medidos em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 284nm e 336nm em cubeta de quartzo. A calibração do aparelho foi realizada com a solução do tubo referência e posteriormente foi realizada a medida dos 3 tubos teste de cada amostra de mel.

As leituras de absorvância de luz que forem superiores a 0,6, deve-se diluir as soluções teste e referência na mesma proporção e repetir a leitura, como indica o método.

O teor de HMF no mel é expresso em $mg.kg^{-1}$ e é calculado pela seguinte fórmula (3):

$$|Abs\ 284 - Abs\ 336| \times F \quad (3)$$

com $F = 149,7$, calculado através da fórmula (4):

$$F = \frac{126 \times 1000 \times 1000}{16830 \times 10 \times 5} \quad (4)$$

Onde:

126 = peso molecular do HMF;

16830 = absorvidade molecular do HMF a 284 nm;

1000 = mg/g;

10 = centilitro/litro;

1000 = g/kg;

5 = gramas de mel.

4.4.3 Umidade

Para a realização da metodologia, cápsulas de porcelana foram deixadas em estufa a 110 °C por duas horas e posteriormente resfriadas em dessecador. Uma a uma, as cápsulas de porcelana foram pesadas em balança analítica, sendo anotada sua massa e posteriormente tarando-as.

Uma tomada de amostra de 2,00 g de mel foi transferida para a cápsula de porcelana previamente pesadas e levadas para estufa a temperatura de 105°C por 5 horas ou a peso constante.

Após a secagem em estufa as cápsulas de porcelana contendo mel foram pesados sendo anotado sua massa e calculado o teor de umidade do mel pela fórmula (5).

$$Umidade (\%) = \frac{(Pu) - (Pa) \times 100}{(Pu) - (Pp)} \quad (5)$$

Onde:

Pu = Peso da cápsula de porcelana + Amostra úmida;

Pa = Peso da cápsula de porcelana + Amostra seca;

Pp = Peso da cápsula de porcelana.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A determinação do teor de peróxido de hidrogênio das amostras de mel foi realizada através do método titulométrico de oxi-redução com o titulante permanganato de potássio (KM_4O_4). Todos os reagentes utilizados para a verificação do peróxido de hidrogênio foram de grau analítico, P.A.

4.5.1 Preparo da Solução de KM_4O_4 0,02 mol.L⁻¹

Em um vidro de relógio pesou-se cerca de 3,40 g de KM_4O_4 , optou-se em preparar uma solução ligeiramente mais forte que 0,02 mol.L⁻¹, pois a solução sofre redução em presença de matéria orgânica em suspensão. O reagente pesado foi transferido para um béquer de 1500 mL de capacidade e misturado a 1 Litro de água destilada. A solução foi agitada com bastão de vidro e levada ao aquecimento sobre tela de amianto em Bico de Bunsen por 15 minutos. Após o período de aquecimento a solução foi deixada em temperatura ambiente para resfriamento e posteriormente filtrada em funil com placa de vidro sinterizado. O filtrado foi recolhido em um balão volumétrico de 1000 mL previamente lavado com solução sulfocrômica e transferido para frasco de cor âmbar de 1 L de capacidade.

4.5.2 Padronização da Solução de KM_4O_4 0,02 mol.L⁻¹

Pesou-se exatamente 0,140 g de oxalato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) (padrão primário), previamente dessecado em estufa a 120°C por duas horas. O reagente foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL, adicionaram-se 50 mL de água destilada e cuidadosamente 10 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 1:1 (v/v). O conjunto foi aquecido até 80°C e posteriormente titulado com a solução de KM_4O_4 , com agitação constante, até o ponto de viragem onde a solução tonava-se levemente rósea, persistente por 30 segundos.

4.5.3 Determinação do teor peróxido de hidrogênio nas amostras de mel

Para cada amostra de mel foi utilizado um balão volumétrico onde foi pipetado e transferido 5 mL de mel e completado com água destilada para o volume de 100 mL. Com uma pipeta volumétrica, transferiu-se 25 mL da solução de mel, anteriormente preparada, para um erlenmeyer e adicionou-se 50 mL de água destilada e 20 mL de ácido sulfúrico 1:5 (v/v) (Solução teste de peróxido de hidrogênio).

Com a solução padronizada de KM_4O_4 foi realizada a titulação até o ponto de equivalência. O conjunto foi aquecido a 60°C e posteriormente finalizando a titulação gota a gota até o aparecimento de coloração rósea. O volume consumido de KM_4O_4 foi anotado e posteriormente o procedimento foi realizado novamente.

Com o valor do volume consumido em cada titulação foi realizado o cálculo de média e calculado o valor da concentração final (C_f), conforme a equação (6):

$$C_f = \frac{(C_i - V_i)}{V_f} \quad (6)$$

Onde:

C_i = Concentração inicial;

V_i = Volume inicial;

C_f = Concentração final;

V_f = Volume final.

A concentração do teor de peróxido de hidrogênio foi calculada pela fórmula (7):

$$C = \frac{m}{MM \times V} \quad (7)$$

Onde:

C = Concentração;

m = Massa em gramas;

MM = Massa molar (H_2O_2);

V = Volume em litros.

O cálculo do teor de peróxido de hidrogênio na solução é calculado como se segue (8):

$$\text{H}_2\text{O}_2(\%) = \frac{\text{mL de KMnO}_4 \text{ consumido na solução } 0,02 \text{ mol.L}^{-1} \times 0,42517}{\text{Peso da amostra (g)}} \quad (8)$$

O resultado fornece a concentração de peróxido de hidrogênio na solução expressa em percentual do peso (g H₂O₂/100g de solução).

4.6 ANÁLISE DE DADOS

A partir da determinação do potencial antibacteriano das amostras de mel de *T. angustula* contra a bactéria *S. aureus* os resultados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ao nível de significância $p < 0,05$, seguido da análise de variância não paramétrica Kruskal-Wallis (teste *H*). A opção pelo teste de Kruskal-Wallis é empregada quando não é observado normalidade dos halos de inibição quando aplicado o teste de Shapiro-Wilk.

Os resultados das análises físico-químicas foram submetidos aos cálculos de média e desvio padrão. A análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *a posteriori* de Dunnett foi utilizado para analisar a diferença entre o mesmo parâmetro nos diferentes tratamentos em função do número de repetições realizadas para cada parâmetro ($n = 3$). O coeficiente de correlação de Pearson foi empregado para verificar o efeito dos parâmetros físico-químicos analisados sobre o potencial antimicrobiano. Correlações significativas ($p < 0,05$) indicam o efeito do parâmetro físico-químico testado sobre a atividade antimicrobiana ou a influência deste sobre outro parâmetro.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* BioEstat 5.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados obtidos dos halos de inibição com base no ensaio *in vitro* com amostras de mel de *T. angustula* do Estado do Paraná pode ser observado na Figura 5.

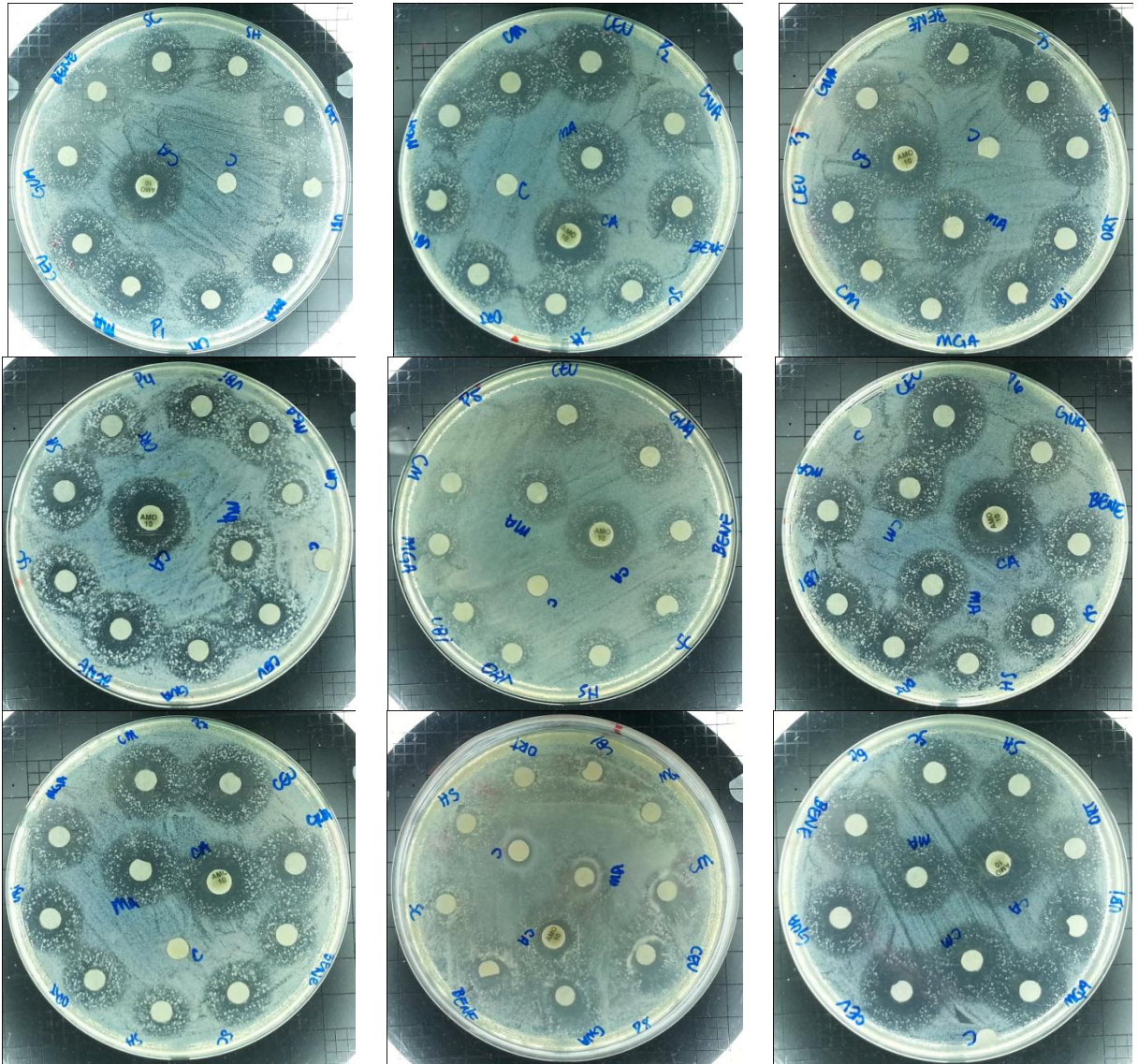


Figura 5 - Halos de inibição formados com amostras de mel de abelhas *T. angustula* do Estado do Paraná (PR) pela metodologia de disco-difusão, identificadas com as siglas do município de procedência frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, demonstrando o nível do potencial antibacteriano após 6 horas de incubação. CA: Controle positivo com antibiótico Amoxicilina (AMO); C: Controle negativo com água destilada.

Os halos de inibição apresentaram valor mínimo de 6,55 mm (GUA) variando até o valor máximo 25,09 mm (CEU), valores médios e a variação em milímetro obtido na leitura para 6 horas são apresentados no Gráfico 1

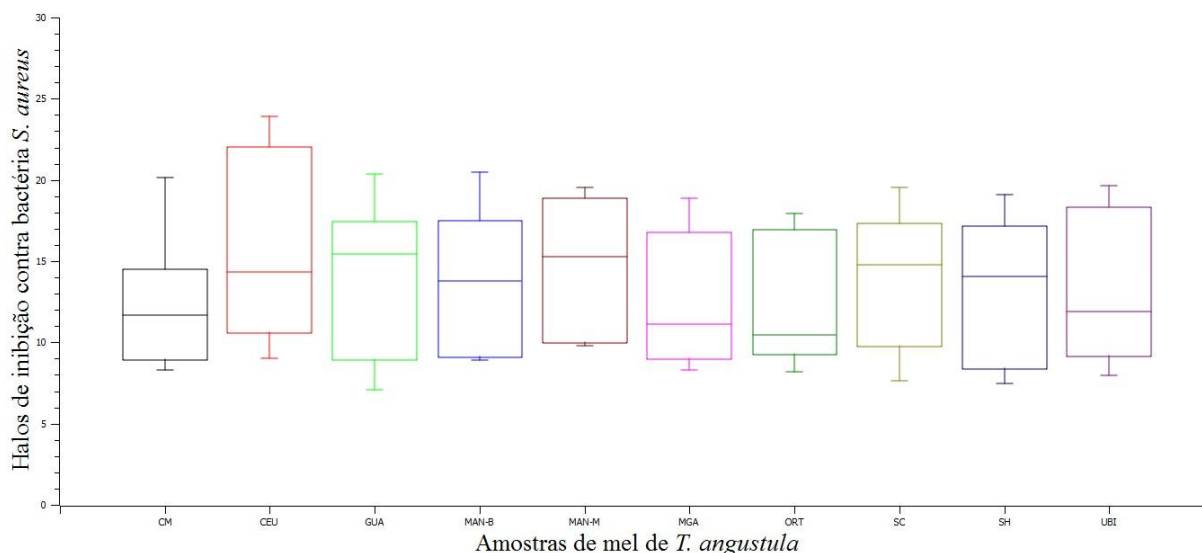


Gráfico 1 – Valores de média, máximo e mínimo em milímetro dos halos de inibição obtidos no teste de sensibilidade a antibiótico – TSA pela metodologia de disco-difusão com amostras de mel de abelha jataí (*T. angustula*) do Estado do Paraná após 6 horas de incubação [(p) Kruskal-Wallis = 0,9414; H=3,4957].

A amostra CEU apresentou na leitura o maior valor médio dos halos com 15,68 mm e para a amostra ORT registrou-se o menor valor médio dos halos (12,69 mm). O valor médio dos halos de inibição do mel de *T. angustula* frente ao micro-organismo *S. aureus* para o período de incubação de 6 horas foi de 13,66 mm e desvio padrão 0,93.

Através do teste estatístico de Shapiro-Wilk em nível de significância de 5% a amostra MAN-M diferiu dos demais tratamentos, sendo realizada a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis. A partir do teste H [(p) Kruskal-Wallis = 0,9414; H=3,4957], verificou-se que as amostras não apresentaram diferença entre os halos de inibição com referência a sua localidade apresentando uniformidade dos halos de inibição para a amostragem do mel de *T. angustula* avaliado.

Os halos de inibição interpretados conforme o procedimento metodológico descrito na Tabela 2 apresentou padrão interpretativo “intermediário”, exceto para amostra CEU (15,68 mm) e MAN-M (14,47 mm) às quais a bactéria *S. aureus* apresentou sensibilidade frente o mel de *T. angustula* amostrado. No controle positivo realizado para verificação da sensibilidade da cepa bacteriana de *S. aureus*, esta se mostrou com padrão interpretativo

“sensível” a amoxicilina (AMO) para 66% dos tratamentos utilizados no período de 6 horas, apresentado o antibiótico valor médio do halo de inibição $18,76 \pm 4,29$ mm.

Os halos de inibição para o período de 9 horas após a incubação pode ser observado na Figura 6. Os registros da leitura dos halos para o período supradito estão apresentados no Gráfico 2.

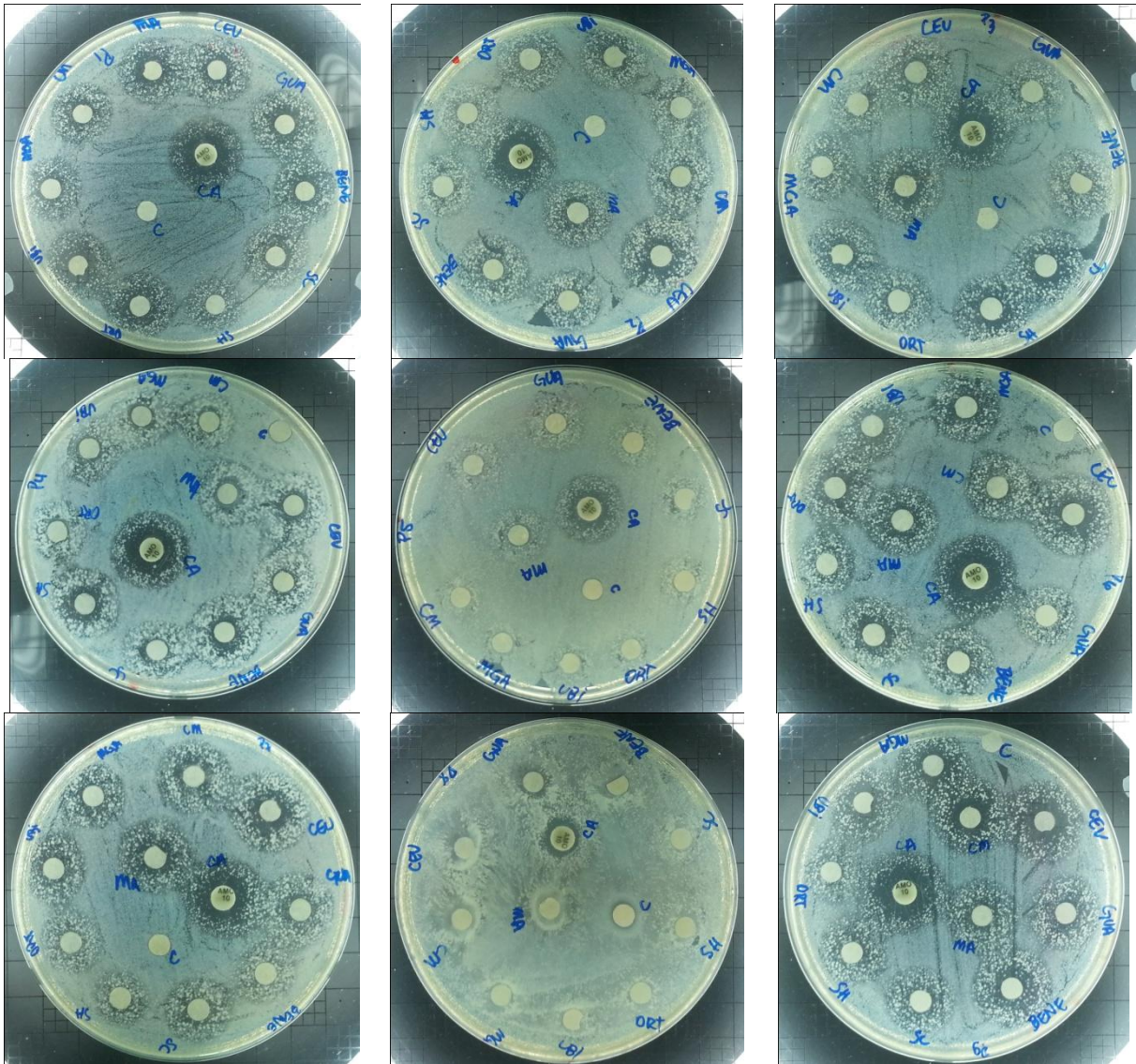


Figura 6 - Halos de inibição formados com amostras de mel de abelhas *T. angustula* do Estado do Paraná (PR) pela metodologia de disco-difusão, identificadas com as siglas do município de procedência frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, demonstrando o nível do potencial antibacteriano após 9 horas de incubação. CA: Controle positivo com antibiótico amoxicilina (AMO); C: Controle negativo com água destilada.

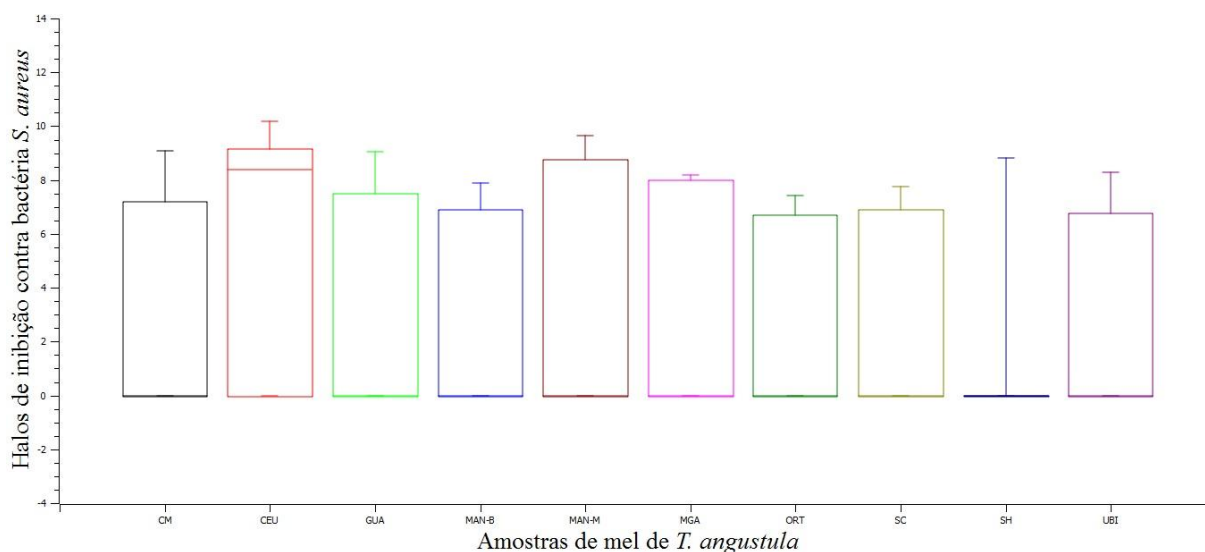


Gráfico 2 - Valores de média, máximo e mínimo em milímetro dos halos de inibição obtidos no teste de sensibilidade a antibiótico – TSA pela metodologia de disco-difusão com amostras de mel de abelha jataí (*T. angustula*) do Estado do Paraná após 9 horas de incubação.

A média dos halos de inibição de *T. angustula* para o período de 9 horas apresentou valor de $3,33 \pm 4,06$ mm. Os maiores valores médio foram das amostras Céu Azul (6,04 mm) e Mandirituba (MAN-M com 4,04 mm) e os menores valores registrado foram da amostra Santa Helena (SH com 1,95 mm) e Ubiratã (UBI com 2,56 mm). Os halos de inibição confrontados com o padrão interpretativo de zonas de inibição (Tabela 2) apresentaram resistência da bactéria *S. aureus* frente à amostragem utilizada do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná. O controle positivo (AMO) apresentou halo de inibição com valor médio de $11,95 \pm 1,18$ mm sendo seu padrão interpretativo conforme a Tabela 2, como “intermediário”.

O controle realizado com antibacteriano amoxicilina (AMO) e água destilada teve como o objetivo principal a verificação do crescimento bacteriano e a comparação do potencial antimicrobiano do mel de *T. angustula* com valores padronizados.

O estudo demonstrou que o mel de abelha nativa *T. angustula* apresentou atividade antimicrobiana contra o micro-organismo testado conforme apresentado no Gráfico 3 os valores médios dos halos de inibição do mel de *T. angustula* e valores obtidos para os discos-controle para o período de 6, 9 e 18 horas. Nas condições de análise, após o período de 18 horas de incubação, somente a ação antimicrobiana do antibiótico AMO foi registrada com valor médio de $5,97 \pm 0,59$ mm para o tratamento, os demais halos de inibição com mel de *T. angustula*, não apresentaram halos de inibição.

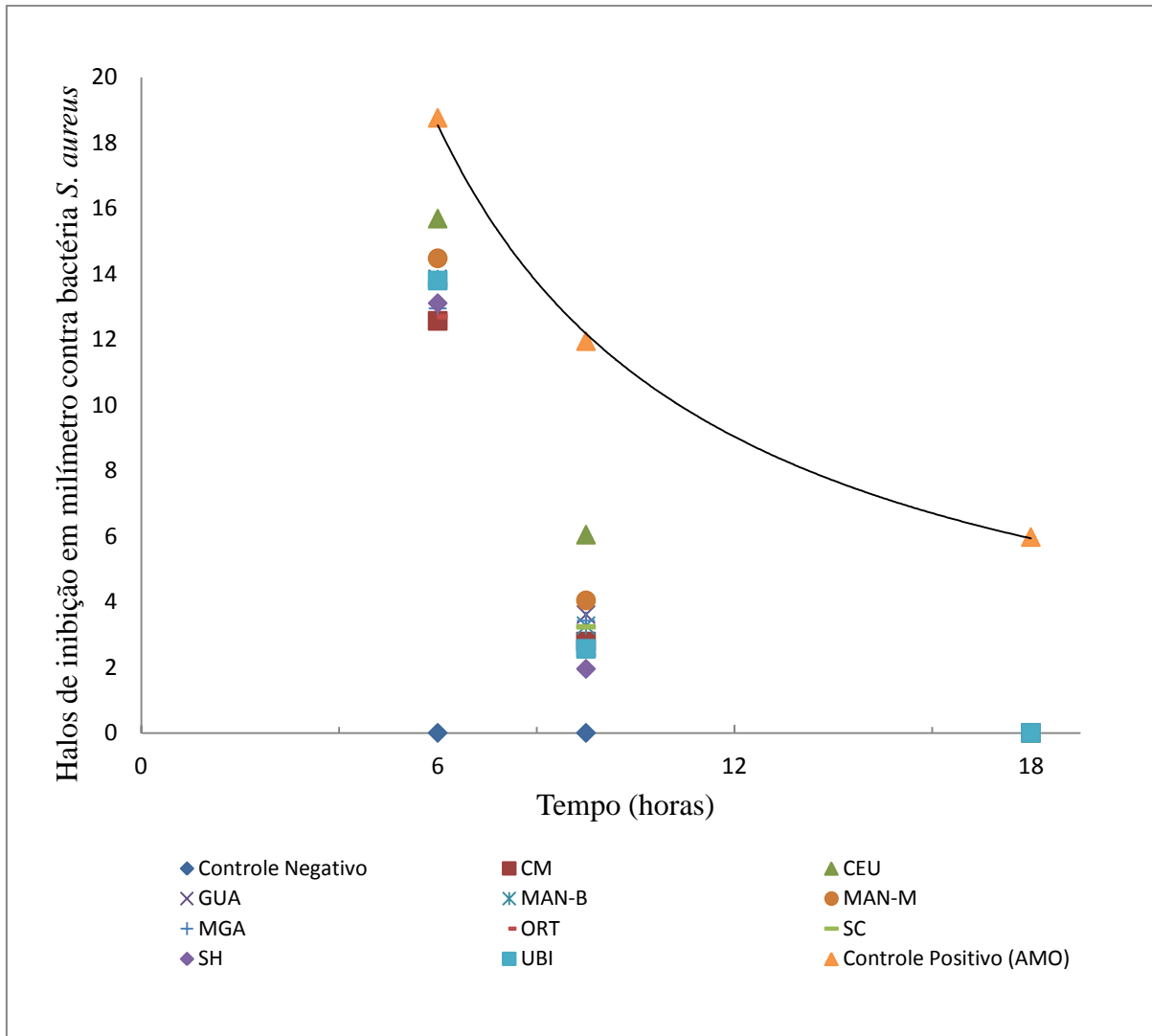


Gráfico 3 - Valores dos halos de inibição obtidos da amostragem do mel de *T. angustula* e valores dos controle positivo (AMO) e controle negativo para o período de 6, 9 e 18 horas pelo teste de sensibilidade a antibiótico - TSA. Linha de tendência da atividade antibacteriana do controle positivo (AMO) [$y=118,88 x^{-1,037}$; $R^2 = 0,9992$].

Embora as amostras tenham apresentado atividade antimicrobiana menos expressiva que o antibiótico empregado neste trabalho, Aligiannis et al. (2001) destacam que não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados a antibióticos padrões. Considerando que os antibióticos são substâncias sintéticas e purificadas, com o espectro de ação estabelecido (PERALTA, 2010). Outro fator essencial a ser considerado é o que se refere à composição físico-química do mel visto que este é um produto biológico e que seus constituintes em proporções variadas correlacionam entre si, ressaltando que este conjunto de substâncias possui efeito variado na expressão da atividade

antimicrobiana de cada mel e que os constituintes químicos esta relacionada à sua origem botânico-geográfica, da espécie da abelha e sobre o micro-organismo alvo.

A atividade antimicrobiana do mel é devido ao peróxido de hidrogênio produzido enzimaticamente (WHITE, SUBERS; SCHEPARTZ, 1963; HOOPER, 1981; MOLAN 1996; SATO e MYATA, 2000). Contudo características particulares de cada micro-organismo possui influência direta nos resultados da atividade antimicrobiana, visto que oferecem reações diversas ao antibiótico via mecanismo de defesa. A exemplo disso é a bactéria *S. aureus* é capaz de produzir a enzima catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio livre, fato que pode explicar o decaimento da atividade antimicrobiana da amostragem estudada entre o período de 6 a 9 horas e a ausência em 18 horas.

A redução da atividade antimicrobiana do controle positivo (AMO) pode ser explicada pela resistência da bactéria *S. aureus* à amoxicilina causada pela produção da enzima β -lactamases pelos estafilococos (SOUZA, REIS e PIMENTA, 2005). A amoxicilina ou penicilina BRL 2333, é uma penicilina semi-sintética cujo mecanismo de ação é semelhante a penicilina G (SOUZA, REIS e PIMENTA, 2005). As enzimas β -lactamases hidrolisam o anel β -lactâmico do núcleo estrutural das penicilinas pela quebra da ligação amida com formação do ácido penicilóico, deste modo o antibiótico perde a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (ALVES-FERREIRA, 2010). Com a finalidade de minimizar a ação da β -lactamases, a amoxicilina é disponível em associação com o ácido clavulânico, que é um inibidor das β -lactamases (NICOLAS-CHANOINE, 1997).

Bazoni (2012), comparando o mel de *T. angustula* de diferentes fontes botânicas e o mel de manuka (*Leptospermum scoparium*) contra a bactéria *S. aureus* não registrou diferença significativa entre as amostras para halos médios de 12 mm. Resultado semelhante ao padrão interpretativo para 18 horas dos halos de inibição da amostragem estudada foi registrada por Gonçalves, Alves-Filho e Menezes (2005), que avaliaram a atividade antimicrobiana do mel de meliponini frente a *S. aureus*, a bactéria apresentou resistência frente ao mel testado, Mercês et al. (2013), estudando a atividade antimicrobiana do mel de abelhas nativas registrou halo de inibição para *T. angustula* de 28,00 pelo método de difusão em poço.

Este estudo foi conduzido a avaliar a atividade antimicrobiana do mel de *T. angustula* *in vitro*, entretanto não significa que ocorra o mesmo comportamento da atividade antimicrobiana *in vivo*. O mel utilizado como tratamento tópico, inibindo o crescimento bacteriano pode promover a limpeza da ferida e a epitelização (MOLAN, 2001); diferente dos

antibióticos sintéticos, que são moléculas com alvos definidos que impedem o crescimento microbiano sem atuar na recuperação do ferimento (SUBRAHMANYAM, 1991).

5.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os valores dos parâmetros físico-químicos recomendado pelo “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Produto Mel” regulamentado pela Instrução Normativa nº 11 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000), Resolução GMC nº 88/99 do Mercosul (MERCOSUL, 1999) e do padrão para o mel do *Codex Alimentarius Commission* (CAC, 1990) são baseado em valores dos parâmetros obtidos para o mel de *A. mellifera*.

O Brasil possui uma grande diversidade de meliponíneos adaptada às condições climáticas e ao amplo espectro floral, além de obter preços mais elevados em comparação com o mel da abelha exótica *Apis mellifera*. Desta maneira apresenta potencial para a exploração de seus produtos. Contudo fatores externos como a espécie da abelha produtora, a fonte de alimento e as condições edáficas e climáticas da região de produção do mel são fontes de variação dos parâmetros e qualidade do mel. Kleinert et al. (2009) a partir da síntese de análises dos parâmetros físico-químicos de 770 amostras de mel *T. angustula* sugeriram valores que podem ser usados para a “Regulamentação Técnica da Qualidade para o Mel de Meliponíneos”.

Na Tabela 3 são apresentados os valores máximos estabelecidos pelos órgãos reguladores para o mel de *A. mellifera* e os valores sugeridos para *T. angustula* das referências supracitadas em comparação com os valores médios obtidos neste trabalho para amostragem de mel de *T. angustula* do Estado do Paraná.

Tabela 3 – Valores recomendados dos parâmetros físico-químicos do mel confrontados aos valores obtidos para amostras do mel de jataí (*Tetragonisca angustula*) do Estado do Paraná.

Referência	Valores recomendados para os parâmetros físico-químicos			
	Acidez (meq.kg ⁻¹)	pH	HMF ¹ (mg.kg ⁻¹)	Umidade (%)
Legislação Brasileira	Máximo de 50	-----	Máximo de 60	Máximo de 20
Legislação do Mercosul	Máximo de 50	-----	Máximo de 60	Máximo de 20
<i>Codex Alimentarius</i>	Máximo de 50	-----	Máximo de 80 em regiões tropicais	Máximo de 20
<i>Tetragonisca angustula</i> *	< 20,60	4,00 – 4,40	< 27,90	< 27,70
Valor médio obtido nas amostras de mel deste trabalho	28,04	3,39	13,43	24,70

*Valores sugeridos por Kleinert et al. (2009).

A partir da análise dos valores obtidos dos parâmetros físico-químicos das amostras do mel de *T. angustula*, verificou-se através do confronto entre os valores (Tabela 3) que o valor médio da umidade das amostras estudadas, não se enquadram nas especificações estabelecidos por Brasil (2000), Mercosul (1999) e Codex (CAC, 1990). Os valores sugeridos por Kleinert et al. (2009) para o mel de meliponíneos também apresentou diferenças quando comparados aos valores médios de acidez e pH.

5.2.1 Acidez livre

Os valores obtidos nas 10 amostras analisadas apresentaram acidez com valores médios 21,20 meq.kg⁻¹ a 33,46 meq.kg⁻¹ (Gráfico 4). Através da análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis e teste *a posteriori* de Dunnett [H = 25,9013; (p < 0,0021)] apenas a amostra SH diferiu estatisticamente das amostras GUA, ORT, SC.

Os menores valores médios obtidos foram da amostra de SH (21,20±0,85 com variação de 20,30 meq.kg⁻¹ a 22,00 meq.kg⁻¹) e UBI (24,10±1,55 meq.kg⁻¹ e variando de 22,60 meq.kg⁻¹ a 25,70 meq.kg⁻¹). Os maiores valores respectivamente foram obtidos para a amostra SC (34,30±1,22 com amplitude de 33,40 meq.kg⁻¹ a 35,70 meq.kg⁻¹) e ORT (33,46±3,04 com variação de 30,00 meq.kg⁻¹ a 35,70 meq.kg⁻¹).

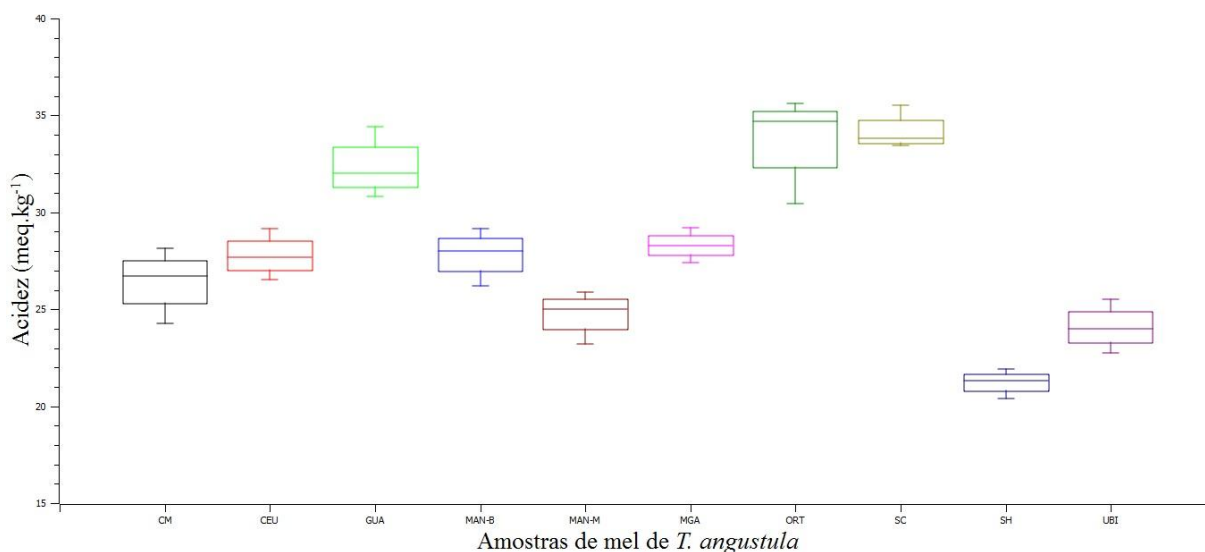


Gráfico 4 – Valores de acidez (meq.kg⁻¹) das amostras analisadas do mel de *T. angustula* produzido no estado do Paraná, coletadas entre setembro/2012 e julho/2013.

Almeida-Anacleto (2007), em seu estudo com a espécie de *T. angustula* obteve valores de acidez de 17 meq.kg⁻¹ a 98,00 meq.kg⁻¹ e com valores médios de 45,23 meq.kg⁻¹; Peralta (2010), apresentou acidez de 98,60 meq.kg⁻¹ e desvio padrão de 2,30 para amostra do mel de abelha *T.angustula* do Estado da Bahia; Chiapetti e Braghini (2013), obtiveram valores de acidez variando de 25,66 meq.kg⁻¹ a 29,31 meq.kg⁻¹ de amostras de mel de abelha *T. angustula* da região sudoeste do Paraná.

A legislação brasileira de qualidade de mel (BRASIL, 2000) permite um teor máximo de acidez igual a 50 meq.kg⁻¹ para o mel de *Apis mellifera* e menor que 20,60 meq.kg⁻¹ como sugerido por Kleinert et al. (2009) para *T. angustula* (Tabela 3). Villas-Bôas; Malaspina (2005) ressaltam que o valor sugerido para a acidez do mel de abelhas sem ferrão no Brasil não ultrapasse 80 meq.kg⁻¹. Os valores médios de acidez obtidos nas amostras deste estudo encontraram-se dentro da amplitude dos valores dos autores supracitados, exceto para Kleinert et al. (2009).

5.2.2 pH

O pH das amostras analisadas variou de 2,84 a 4,00 (Gráfico 5). Os menores e maiores valores foram, respectivamente, da amostra MGA com média de 2,84±0,04 e SC com valor

médio $4,02 \pm 0,02$. Através da análise do teste *H* seguido do teste de Dunnett [$H = 26,9132$; ($p < 0,0014$)], verificou-se estatisticamente que a amostra MGA diferiu das amostras GUA e SC quanto ao parâmetro pH (Gráfico 5).

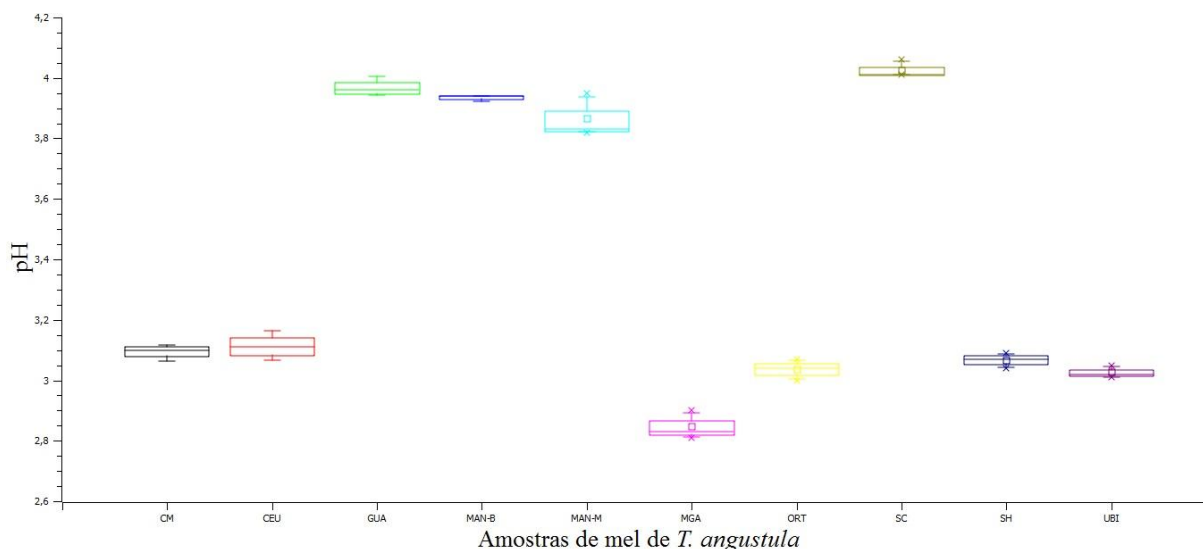


Gráfico 5 - Valores do pH obtido das amostras analisadas do mel de *T. angustula* produzido no estado do Paraná, coletadas entre setembro/2012 e julho/2013.

Os valores comparados com trabalhos realizados com a amostra de *T. angustula* em outros estados brasileiro encontrou-se dentro da amplitude dos valores publicados por Iwama (1977) com variação de 3,20 a 7,40 para a abelha de *T. angustula* ($n=261$ amostras). Almeida-Anacleto (2007), obteve valores de pH para amostras de *T. angustula* provenientes de Piracicaba – SP que variaram de 3,27 a 4,64 com valor médio de 4,00. Peralta (2010) analisando mel de abelha *T. angustula* do Estado da Bahia, apresentou pH de 3,8. Bazoni (2012), em seu estudo analisando mel de *T. angustula* dos Estados de São Paulo e Minas Gerais apresentaram pH na faixa de 3,72 e 3,20 respectivamente. Chiapetti e Braghini (2013), registraram valores de pH entre 4,01 e 4,38 para amostras do Sudoeste do Paraná.

O valor médio do pH do mel de *T. angustula* analisado e confrontado com valores dos autores supracitados, apresentou ligeira diferença, exceto para a amplitude registrada por Iwama (1977) e Almeida-Anacleto (2007). Crane (1983), ressalta que o valor do pH está diretamente relacionado com a composição florística dos locais de coleta, desta maneira pode-se aferir que a diferença do valor do pH do mel amostrado neste trabalho comparados com valores de regiões distintas deve-se a diferença da origem botânica, contudo esta afirmação

deve ser melhor estudada para esclarecer a diferença no valor do pH. Souza et al. (2006) ressalta a necessidade de obtenção de dados complementares como a análise polínica para a verificar a diferença dos valores de pH.

Notou-se que alguns valores de acidez e pH não estavam proporcionalmente relacionados, visto que amostras de menor pH não apresentaram obrigatoriamente maior acidez, a exemplo das amostra advindas de Ubiratã (UBI) que apresentou acidez de $24,10 \pm 1,55 \text{ meq.kg}^{-1}$ e pH de $3,02 \pm 0,02$ e a amostra ORT que apresentou valor médio de acidez média superior ao da amostra supradita ($33,46 \pm 3,04 \text{ meq.kg}^{-1}$) e pH equivalente ($3,03 \pm 0,03$) (APÊNDICE A). Esta análise difere de Chiapetti e Braghini (2012), que verificaram para o mel de *Apis mellifera* e *T. angustula* relação direta entre os parâmetros de acidez e pH.

5.2.3 Hidroximetilfurfural

Os valores do conteúdo de hidroximetilfurfural obtidos para este trabalho as 10 amostras de mel de *T. angustula* apresentam valor médio de $13,43 \pm 7,87 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Tabela 3), variando de $2,10 \text{ mg.kg}^{-1}$ a $28,74 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Gráfico 6).

Os menores valores registrados foram das amostras MAN-M partindo de $2,10 \text{ mg.kg}^{-1}$ a $2,40 \text{ mg.kg}^{-1}$ com média de $2,27 \pm 0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$, SC (média de $3,11 \pm 0,24 \text{ mg.kg}^{-1}$ e amplitude $2,87 \text{ mg.kg}^{-1}$ a $3,36 \text{ mg.kg}^{-1}$) e CEU ($4,20 \pm 0,50 \text{ mg.kg}^{-1}$ variando de $3,70 \text{ mg.kg}^{-1}$ a $4,71 \text{ mg.kg}^{-1}$) respectivamente (Gráfico 6). Os maiores valores demonstrados foram obtidos das amostras MAN-B ($26,78 \pm 1,74 \text{ mg.kg}^{-1}$) seguido das amostras GUA ($18,22 \pm 1,79 \text{ mg.kg}^{-1}$), SH ($17,67 \pm 0,66 \text{ mg.kg}^{-1}$) e MGA ($16,75 \pm 1,05 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Constatou-se através do teste *H* e teste de Dunnett [$H = 27,4169$; ($p < 0,0012$)] entre a amostra MAN-B na qual os valores registrados diferiram estatisticamente das amostras MAN-M e SC.

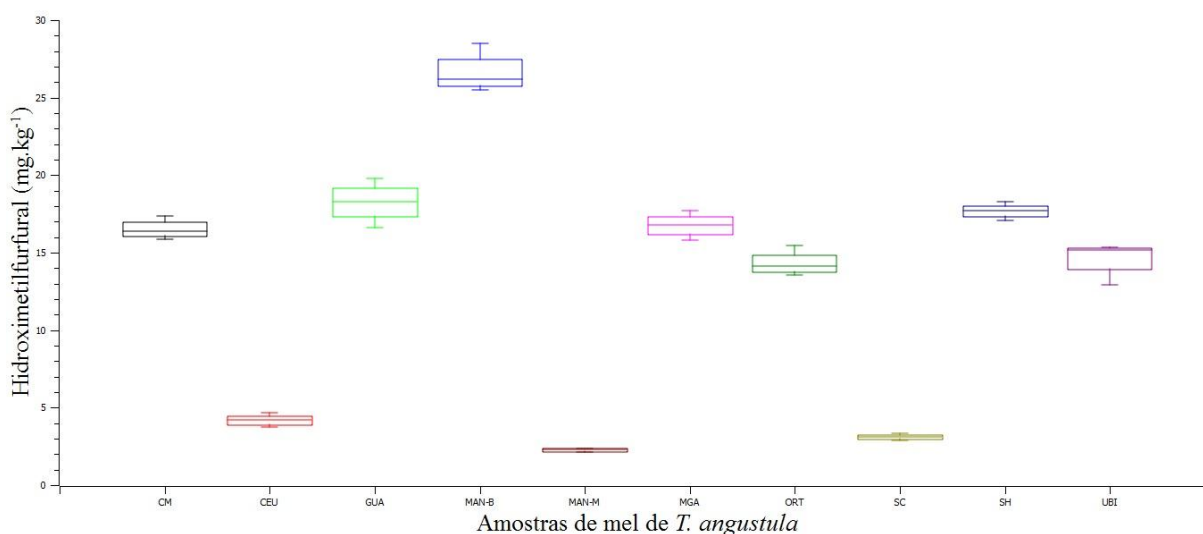


Gráfico 6 - Valores de hidroximetilfurfural (mg.kg⁻¹) registrado das amostras analisadas do mel de *T. angustula* produzido no estado do Paraná, coletadas entre setembro/2012 e julho/2013.

Sete das dez amostras utilizadas nesse estudo foram submetidas a tratamento térmico. Observando os valores de HMF (Gráfico 6), as amostras CM ($16,56 \pm 0,86$ mg.kg⁻¹), MGA ($16,75 \pm 1,05$ mg.kg⁻¹) e UBI ($14,41 \pm 1,48$ mg.kg⁻¹) que não foram submetidas a tratamento térmico e apresentaram maiores valores de HMF quando comparados às amostras CEU ($4,20 \pm 0,50$ mg.kg⁻¹), MAN-M ($2,27 \pm 0,15$ mg.kg⁻¹) e SC ($3,11 \pm 0,24$ mg.kg⁻¹) processadas termicamente. Em países subtropicais, devido a altas temperaturas, o mel pode naturalmente apresentar um alto conteúdo de HMF sem que o produto tenha sido superaquecido ou adulterado (WHITE, 1992).

Vit et al. (1998), apresentaram em seu estudo com abelhas da tribo Trigonini valores variando de 4,20 mg.kg⁻¹ a 20,40 mg.kg⁻¹; Almeida-Anacleto (2007), obteve para a espécie de *T. angustula* valores mínimo partindo de 0,75 mg.kg⁻¹ e valores máximo de 30,58 mg.kg⁻¹ com valor médio 9,36 mg.kg⁻¹ e desvio padrão igual a 8,60; Osterkamp (2009), obteve valores para abelha *T. angustula* da região do Vale do Taquari no Estado do Rio Grande do Sul valor mínimo de 2,38 mg.kg⁻¹ e máximo de 46,61 mg.kg⁻¹ com média de 20,12 mg.kg⁻¹; Souza (2008) em seu trabalho com mel de *T. angustula* provenientes do Estado da Bahia registrou valores para HMF variando de 0,80 mg.kg⁻¹ a 21,20 mg.kg⁻¹. Villas-Bôas e Malaspina (2005) pesquisando o mel de meliponíneos, sugeriram que os valores de HMF não devem ser superiores a 40 mg.kg⁻¹.

Em relação aos valores obtidos neste trabalho e comparados com os valores apresentados na Tabela 3, o HMF das amostras mel de *T. angustula* analisadas neste estudo

encontraram-se dentro do limite recomendado, assim como para a amplitude dos valores referenciados pela literatura consultada supracitada.

5.2.4 Umidade

O parâmetro umidade para as 10 amostras de mel de *Tetragonisca angustula* variou de 17,67% a 30,65% (valor médio 24,40%) (Gráfico 7). Em análise não paramétrica de Kruskal-Wallis e teste Dunnett demonstrou diferença [$H = 25,9013$; ($p < 0,0021$)] para o teor de umidade da amostra SH ($23,86\% \pm 1,61$) com as amostras GUA ($22,78\% \pm 3,46$), ORT ($17,66\% \pm 2,57$) e SC ($24,54\% \pm 6,53$).

Os valores obtidos para o parâmetro umidade excedeu o limite estabelecido pelos órgãos reguladores que é de no máximo de 20% (Tabela 3), exceto para a amostra ORT que obteve a menor média de 17,66% entretanto apresenta valor do desvio padrão de 2,57 e valores de umidade variando de 13,33% a 22,24% oposto a este valor o maior teor de umidade foi registrado para a amostra UBI que variou com valor mínimo de 28,15%, valor máximo 33,49% e valor médio de 30,65% como apresentado no Gráfico 7.

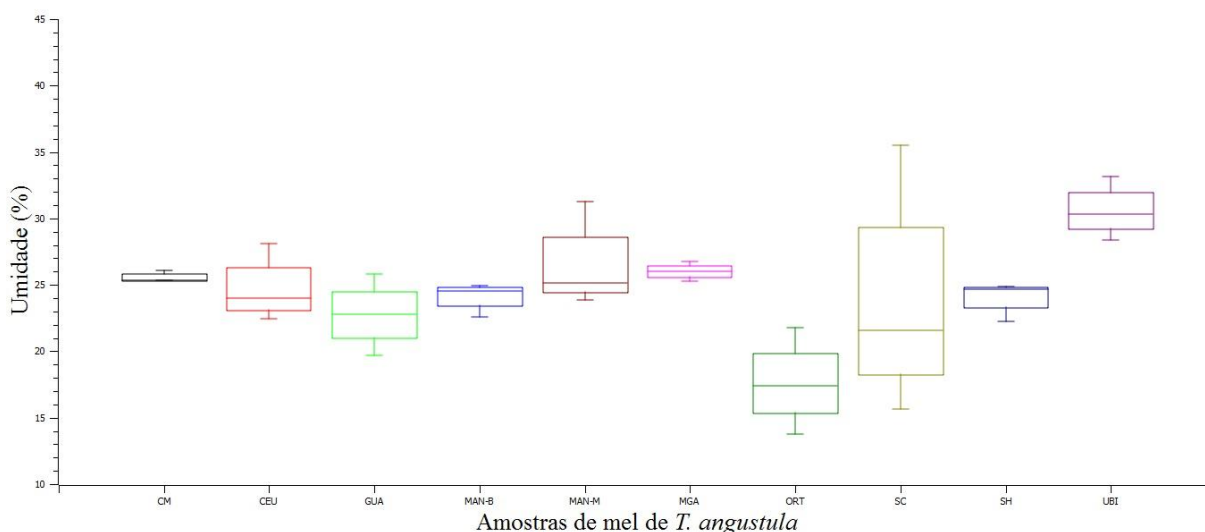


Gráfico 7 – Percentual de umidade obtidos através do método gravimétrico das amostras do mel de *T. angustula* produzidas no Estado do Paraná coletadas entre setembro/2012 e julho/2013.

O mel de meliponíneos apresentou um teor de umidade acima do normalmente citado na literatura para o mel de *Apis mellifera* onde a quantidade de água pode variar de 15 a 21% (KERR, CARVALHO e NASICMENTO, 1996; AZEREDO et al. 1998). Iwama (1977) registrou para 261 amostras de *T. angustula* do Estado de São Paulo valores de umidade média de 27,70%; Almeida (2002), obteve média de 25,50% para *T. angustula* do cerrado paulista. Vit et al. (1998), registraram variação de 22,90% a 31,50% para Meliponini e 17,90% a 29,50% para Trigonini.

Conforme a Tabela 3, o valor para umidade sugerido por Kleinert et al. (2009), compilados de 770 amostras de mel de *T. angustula* possui valor máximo de 27,70% de teor de água, em análise pelo Gráfico 7, a amostra UBI ultrapassa o valor estabelecido pelo autor supradito, contudo considerando a amplitude dos valores obtidos e o desvio padrão das amostras MAN-M ($26,95 \pm 4,40$), SC ($24,54 \pm 6,53$) estes representantes também excederiam o limite proposto pelos autores em 2009. Villas-Bôas e Malaspina (2005) reconhecendo a elevada umidade do mel de meliponíneos do Brasil, sugeriram o teor de umidade máximo de 35% do mel das abelhas nativas. Considerando o valor sugerido pelos autores sobredito, o teor de umidade da amostragem estudada encontra-se dentro do percentual de umidade proposto.

5.3 ANÁLISE DO NÍVEL DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL A PARTIR DAS VARIAÇÕES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

O estudo e entendimento do potencial antimicrobiano se faz necessária com vista a averiguar a contribuição dos parâmetros sobre o potencial antimicrobiano do mel. As características físico-químicas dos constituintes do mel resultam na sua qualidade, que associadas determinam a sua atividade biológica. Desta forma os parâmetros: acidez, pH, hidroximetilfurfural e umidade foram analisados de forma a verificar incidência dos parâmetros nas particularidades da atividade antimicrobiana do mel. Os cálculos do coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros físico-químicos foram realizados com valores obtidos dos halos de inibição para o período de 6 horas.

5.3.1 Acidez e pH

De acordo com White (1979), a acidez do mel é influenciada por diferentes fatores como a origem floral, resultando na variação dos ácidos orgânicos presentes no néctar alterando assim a atividade enzimática da glicose-oxidase proveniente das glândulas hipofaríngeas das abelhas. Bogdanov (1997), afirma que o mel sofre maior influência da acidez livre e total na atividade antimicrobiana do que o parâmetro pH, entretanto o mesmo autor, reconhecendo a fração ácida como responsável pelo potencial antimicrobiano, sugere que o pH do mel pode agir complementarmente como um fator inibitório.

Em análise da contribuição da acidez no halo de inibição, a amostra proveniente de Francisco Beltrão (SC) obteve maior média de acidez de $34,30 \pm 1,22$ meq.kg⁻¹ e halo médio de inibição de $13,67 \pm 4,89$ mm para o período de 6 horas contra a bactéria *S. aureus*, em contraposto a amostra proveniente de Santa Helena (SH) apresentou baixo valor médio de acidez ($21,20 \pm 0,85$ meq.kg⁻¹) e halo de inibição com média $13,10 \pm 4,69$ mm para o mesmo período. O mel de Céu Azul (CEU) apresentou acidez média de $27,80 \pm 1,45$ meq.kg⁻¹ e halo de inibição ($15,68 \pm 6,29$ mm), diâmetro do halo superior em comparação com a amostra SC. Valor médio semelhante de acidez de CEU foi obtido para MAN-B ($27,76 \pm 1,66$ meq.kg⁻¹) contudo registrando valor de $13,84 \pm 4,82$ mm, medida inferior de halo de inibição para amostra proveniente de Céu Azul, para leitura após 6 horas de incubação.

Na verificação da incidência da acidez sobre a atividade antimicrobiana foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre acidez e halos de inibição das amostras frente ao micro-organismo teste. Como ilustrado no Gráfico 8, a dispersão da correlação de Pearson para os valores de acidez versus halos de inibição obtido das amostras de mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra a bactéria *S. aureus* não apresentou correlação para o parâmetro acidez e os halos de inibição obtidos contra *S. aureus* com valores de [(r) Pearson = - 0,0177; (p = 0,8638)].

Embora a acidez do mel possa ser um fator significativo no potencial antibacteriano, para a amostragem deste estudo com mel de *T. angustula* proveniente do Estado do Paraná, pode-se depreender que este parâmetro analisado neste estudo não incide sobre a atividade antimicrobiana do mel.

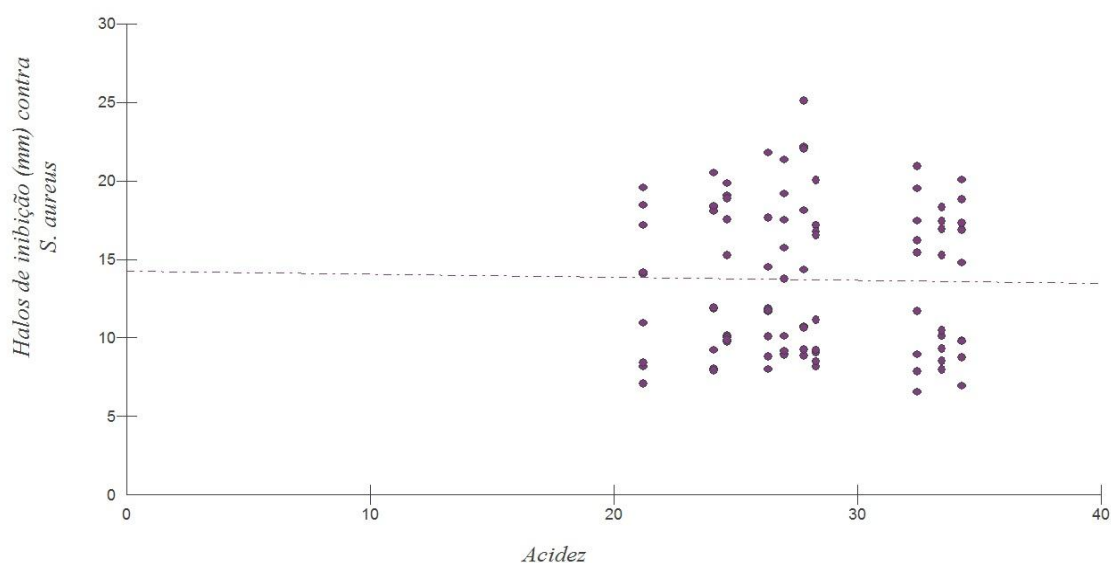


Gráfico 8 – Diagrama de dispersão da correlação de Pearson entre acidez e halos de inibição (mm) do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra bactéria Gram-positiva *S. aureus*; [(r) Pearson = - 0,0177; (p) = 0,8638].

O pH para o mel de abelhas sem ferrão e *A. mellifera* não é estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000). Embora o pH não seja indicado pela Instrução Normativa nº11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000), caracterizar este parâmetro torna-se importante pois influencia na velocidade de formação do hidroximetilfurfural (SOUZA; BAZLEN, 1998; SILVA; QUEIROZ e FIGUEIREDO, 2004). Segundo Crane (1987), o pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar, devido a particularidades da origem floral das áreas de coleta. Evangelista-Rodrigues et al. (2005), ressaltam que substâncias acrescidas no mel pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas também pode alterar o pH do mel. De acordo com Nogueira-Neto (1997), a faixa de variação de pH para que possa ocorrer crescimento de patógenos animais normalmente varia entre 7,2 e 7,4. Entretanto, Peralta (2010) resalta que o pH mínimo para o crescimento de algumas bactérias seja próximo a 4. Molan (1992) destaca que bactérias encontradas em feridas, como a exemplo de bactérias de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus* sp. podem crescer em valores mínimos de pH que podem variar de 4,00 a 4,50.

Nas amostras do mel de *T. angustula*, não foi observada relação do pH com o potencial antimicrobiano visto que a amostra UBI com pH de $3,02 \pm 0,02$ obteve halo de inibição em milímetros com valor médio de $13,80 \pm 5,01$ contra valores superiores de pH $3,97 \pm 0,03$ e halos com $13,84 \pm 5,25$ mm de Guaraqueçaba (GUA) e pH $3,93 \pm 0,01$ e halos de $13,84 \pm 4,82$

mm do mel de Mandirituba (MAN-M), evidenciando valores semelhantes a medida do halo de Ubiratã que possui menor pH.

Conforme o coeficiente de correlação de Pearson [r Pearson = 0,0526 e $(p) = 0,6221$] (Gráfico 9) é possível inferir que o pH não apresentou correlação para o potencial antimicrobiano da bactéria testada.

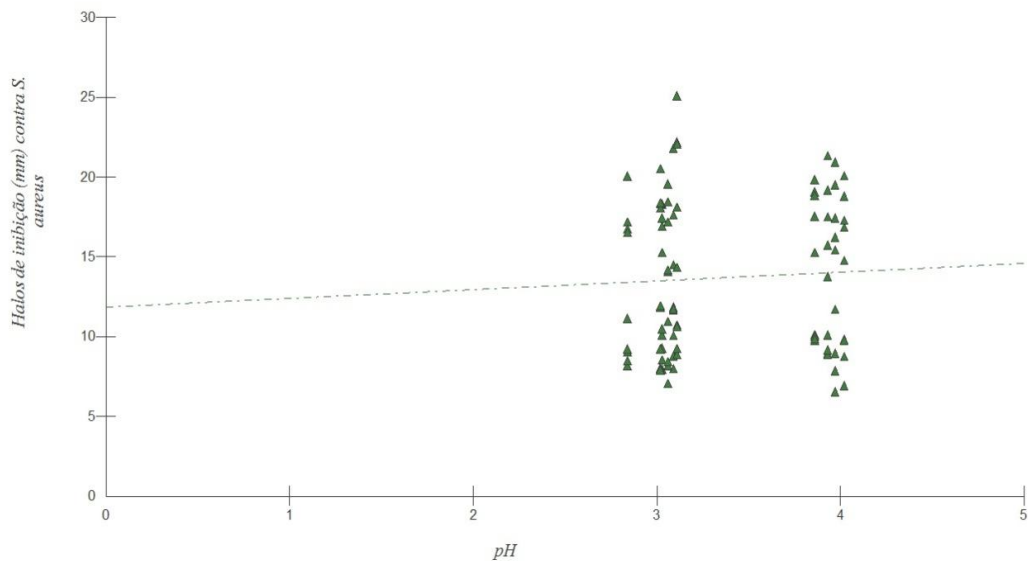


Gráfico 9 – Diagrama da dispersão da correlação de Pearson entre pH e halos de inibição (mm) do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra bactéria Gram-positiva *S. aureus*; [r (Pearson) = 0,0526; $(p) = 0,6221$].

Podemos assinalar que embora os ácidos presentes na solução do mel possam contribuir para a sua estabilidade frente a micro-organismos, a acidez e o pH das amostras de *T. angustula* do Estado do Paraná não demonstraram relação direta na expressão da atividade antimicrobiana (Gráfico 8 e 9).

Estes resultados levam a concluir que outros fatores possam estar envolvidos na atividade biológica do mel contra o micro-organismo alvo. Dada que a constituição química do mel está intimamente ligada à sua origem botânica e que metabolismo secundário das plantas ocorrem no mel, influenciando as variações qualitativas e quantitativas (PERALTA, 2010).

5.3.2 Hidroximetilfurfural

Veríssimo (1988) ressalta que o elevado conteúdo de HMF indica uma queda no valor nutritivo do mel, pela desnaturação, por meio de aquecimento de algumas vitaminas e enzimas termolábeis. Com o aquecimento do mel, a ação das enzimas termolábeis presentes no mel tem sua atividade diminuída conforme há o aumento da temperatura (SCHWEITZER, 2001). Desta maneira, embora não constitua um fator determinante da atividade inibidora de bactérias, o HMF tem relação com a diminuição da atividade enzimática assim como a degradação do conteúdo de enzimas no mel. Vilhena e Almeida-Muradian (1999), afirmam que quando o HMF apresenta concentrações elevadas poderá ter ocorrido a perda de enzimas, como por exemplo, a glicose-oxidase.

Foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson (r) com a finalidade em verificar a contribuição do HMF sobre a atividade antimicrobiana. O Gráfico 10 apresenta a dispersão da correlação para os valores de HMF e halos de inibição do mel de abelhas sem ferrão do Estado do Paraná contra à bactéria *Staphylococcus aureus*.

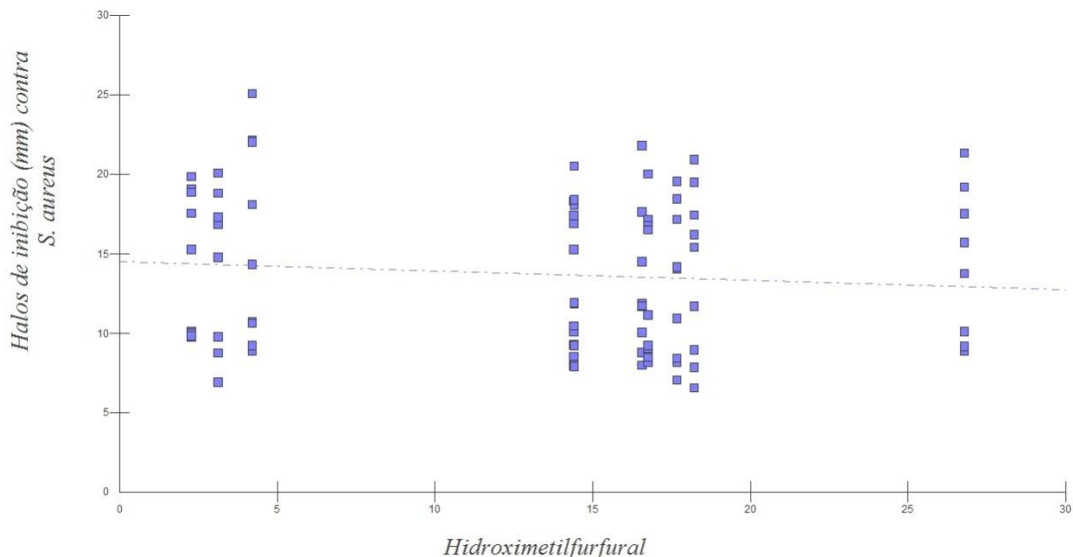


Gráfico 10 - Dispersão da correlação de Pearson entre hidroximetilfurfural e halos de inibição (mm) do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra bactéria Gram-positiva *S. aureus*; [r (Pearson) = 0,0927; (p) = 0,3850].

Nas amostras analisada foi observada correlação entre o parâmetro HMF e os halos de inibição apresentadas contra *S. aureus*, r (Pearson) = 0,0927 e nível de decisão superior a 5% ($p = 0,3850$).

De acordo com White (1979); Salinas; Espinosa-Mansilla e Berzas-Nevado (1991) o conteúdo de hidroximetilfurfural pode ser afetado pela acidez, pH, conteúdo de água e minerais. Frías e Hardisson (1992) destacam que o mel superaquecido por decomposição de certos açúcares, os quais, por sua vez, decompõem-se nos ácidos levulínicos e fórmico, contribuindo para maiores valores de acidez. Osterkamp (2009), afirma que mel ácidos que possuem pH variando de 3,5 a 4 são mais sensíveis a produção de HMF, aumentando rapidamente o seu teor.

Verificando-se a correlação entre os parâmetros acidez, pH e umidade na contribuição do teor de HMF foram calculados os coeficientes de Pearson (r) com 5% de significância. Os resultados da análise de correlação dos parâmetros acidez, pH e umidade *versus* HMF estão apresentados nos Gráficos 11, 12 e 13 respectivamente.

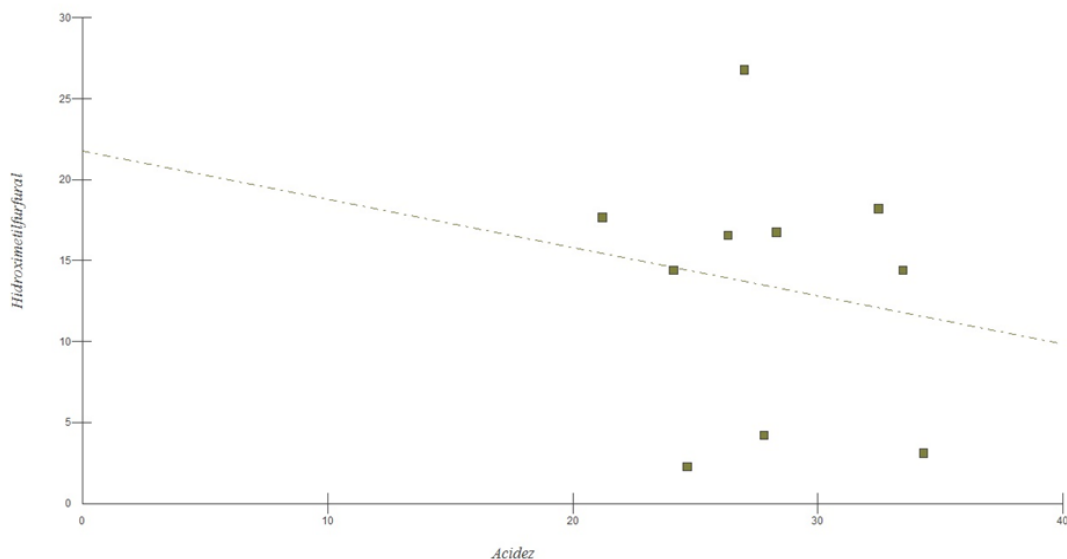


Gráfico 11 - Dispersão da correlação de Pearson entre hidroximetilfurfural e acidez do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná. [r (Pearson) = - 0,1626; (p) = 0,6536].

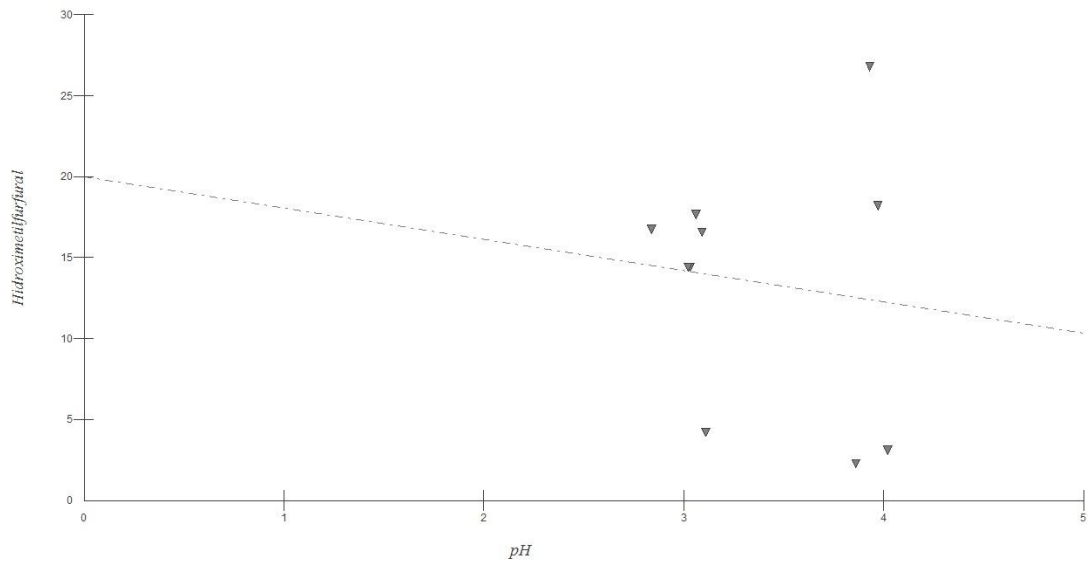


Gráfico 12 - Dispersão da correlação de Pearson entre hidroximetilfurfural e pH do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná. [r(Pearson) = - 0,1186; (p) = 0,7442].

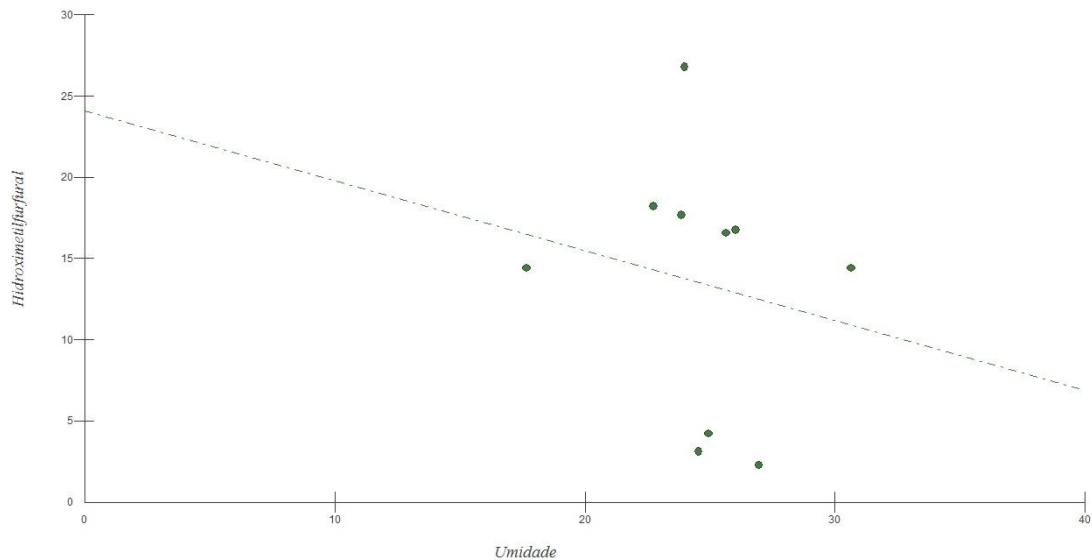


Gráfico 13 - Dispersão da correlação de Pearson entre hidroximetilfurfural e umidade do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná. [r(Pearson) = - 0,1798; (p) = 0,6192].

A análise dos parâmetros acidez, pH e umidade entre o teor de HMF não apresentaram correlação ($p > 0,05$). Como exposto nos Gráfico 11, 12 e 13 e o resultado do cálculo do coeficiente de Pearson [r(Pearson) = - 0,1626; (p) = 0,6536] para acidez; [r(Pearson) = - 0,1186; (p) = 0,7442] para o pH e [r(Pearson) = - 0,1798; (p) = 0,6192] para a umidade

evidenciam que para esta amostragem destes parâmetros não tiveram relação com o conteúdo de HMF. Contudo o HMF é um indicador secundário de qualidade do mel e que este quando apresenta teor elevado indica uma queda no valor nutritivo do mel, pela destruição por meio de aquecimento de algumas vitaminas e enzimas termolábeis. Embora Gonnet; Lavie (1960) constatarem que mel tratado termicamente ainda apresentava valores antibióticos.

O resultado já era esperado dado que o HMF foi analisado de forma pontual não sendo verificado a sua variação em relação com tempo e temperatura e a variação dos parâmetros correlacionados conforme observado por Souza-Freitas et al. (2010), que trataram o mel termicamente e observam a redução proporcional da acidez e umidade com o aumento do HMF. Entretanto a detecção do HMF verificado de forma pontual em determinado período, não significa que o mel de *T. angustula* não possua propriedades antimicrobianas como observado neste trabalho.

O estudo da correlação dos parâmetros, o conteúdo de HMF e o tratamento térmico variando com o tempo devem ser mais aprofundados para elucidar a contribuição destes na atividade e a atividade antimicrobiana do mel.

5.3.3 Umidade

O mel mais úmido confere uma menor viscosidade (GROSSI, 1998). Esta característica faz com que a atividade da enzima glicose-oxidase seja mais intensa no mel havendo maior produção de ácido glicônico, acarretando em pH relativamente baixo e acidez livre alta (NOGUEIRA-NETO, 1997). Partindo do pressuposto que a ação antimicrobiana de uma amostra de mel pode estar intimamente relacionada ao conteúdo de água, foi calculado o coeficiente de Pearson (r).

O resultado obtido pelo coeficiente da correlação de Pearson (r) indica que a umidade não possui correlação com os halos de inibição [$r(\text{Pearson}) = 0,0562$; (p) = 0,5985] (Gráfico 14).

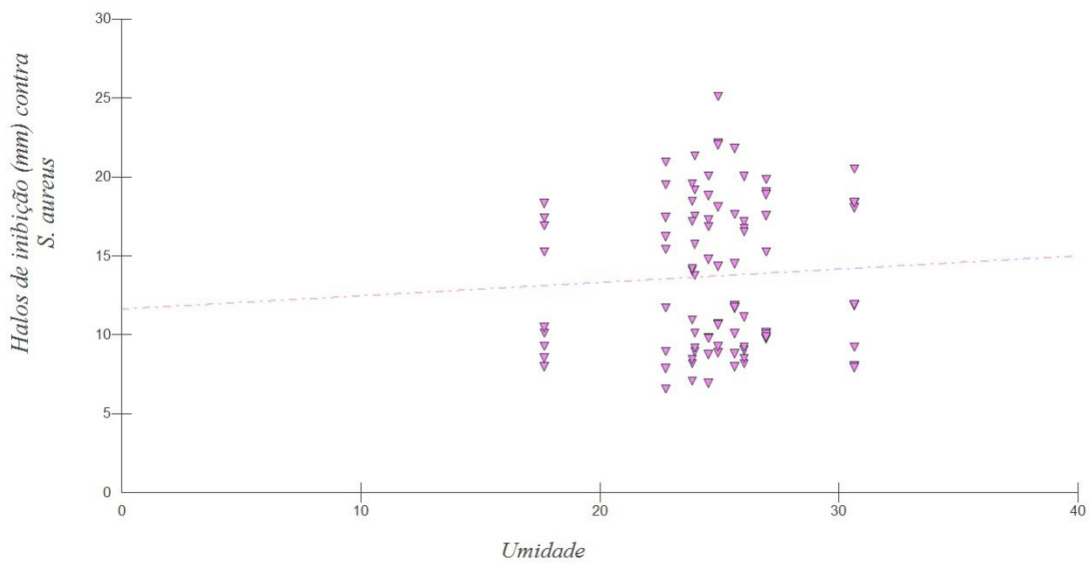


Gráfico 14 – Diagrama da dispersão da correlação de Pearson entre umidade halos de inibição do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná contra bactéria Gram-positiva *S. aureus*; [r(Pearson) = 0,0562; (p) = 0,5985].

Considerando que a umidade tem participação no aumento da acidez e no decréscimo do pH conforme cita Nogueira-Neto (1997), foram calculados os coeficientes de Pearson a fim de verificar a contribuição da umidade na variação destes parâmetros.

No Gráfico 15 é apresenta a dispersão do coeficiente de Pearson para a correlação entre acidez e umidade, seguido do Gráfico 16 expondo o diagrama da dispersão obtido para pH *versus* umidade.

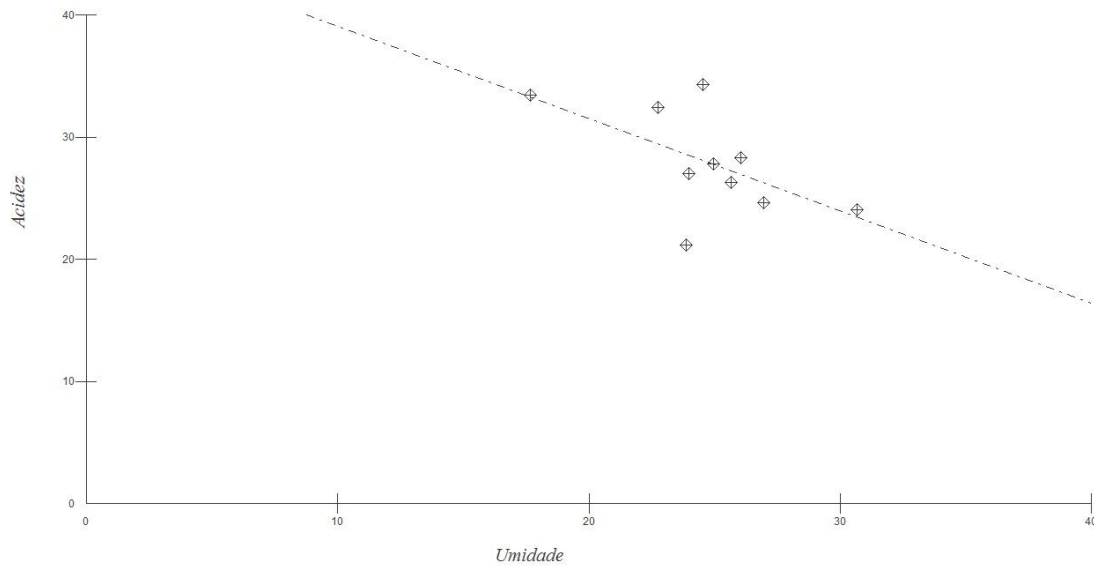


Gráfico 15 – Diagrama da dispersão da correlação de Pearson entre acidez e umidade do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná; [r(Pearson) = - 0,05789; (p) < 0,05].

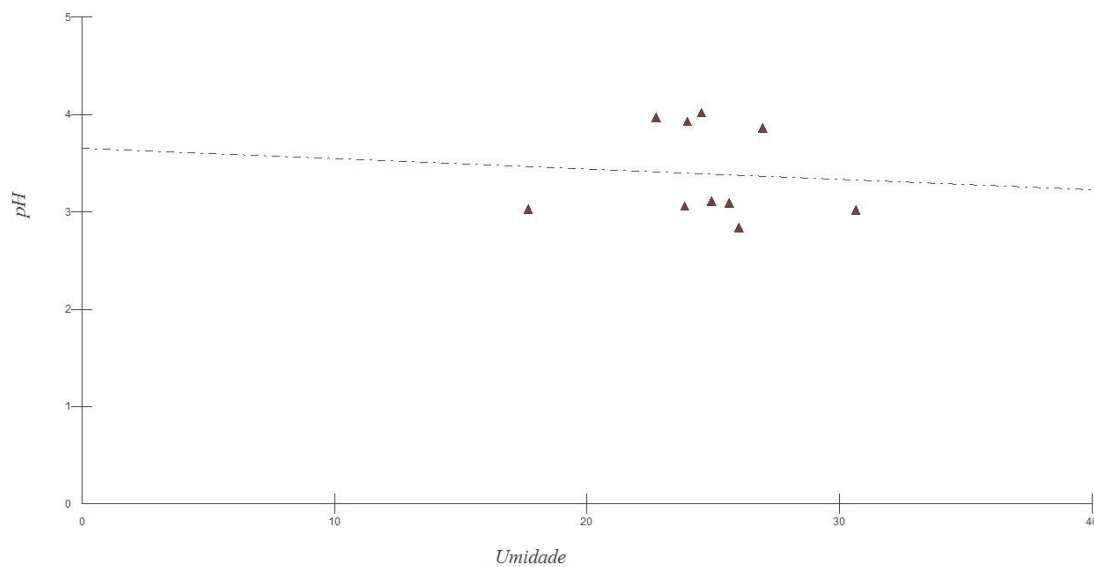


Gráfico 16 - Diagrama da dispersão da correlação de Pearson entre pH e umidade do mel de *T. angustula* do Estado do Paraná; [r(Pearson) = - 0,0727; (p) = 0,4961].

Os dados da análise estatística de coeficiente de Pearson entre a acidez e umidade do mel de *T. angustula*, apresentou [r(Pearson) = - 0,05789; (p) < 0,05] (Gráfico 15). Para a correlação de pH e umidade foi obtido [r(Pearson) = - 0,0727; (p) = 0,4961], conforme apresentado no gráfico 16.

Nota-se que não houve correlação para os dois parâmetros analisados em relação a umidade (valores de r (Pearson) negativo e valores de (p) superiores a 0,05). Estes valores podem indicar que estes parâmetros não interferiram diretamente na umidade, embora possam ter influência sobre outros parâmetros físico-químicos que atuam na expressão da ação contra micro-organismos.

5.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Os resultados obtidos para quantificação do percentual de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do mel (Gráfico 17).

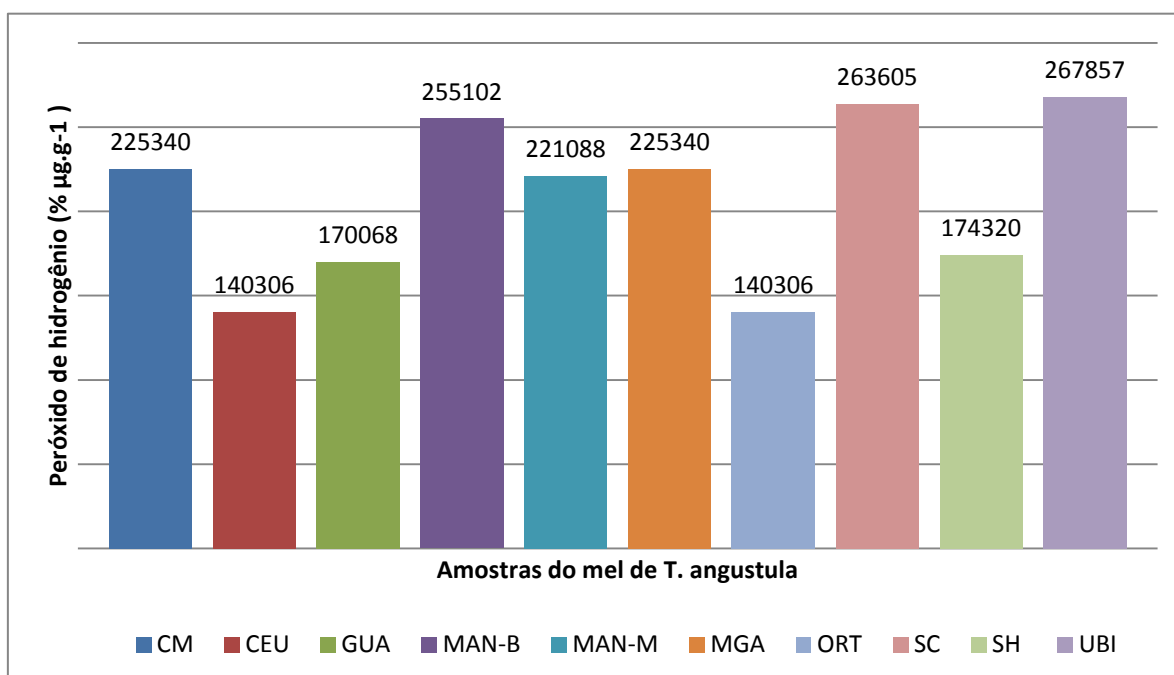


Gráfico 17 – Concentração do peróxido de hidrogênio do mel de *T. angustula*.

Os teores de peróxido de hidrogênio quantificados das amostras de mel estudado evidenciam a presença do peróxido de hidrogênio no mel.

Para o período de 6 horas de incubação, os halos de inibição em comparação com o percentual de peróxido de hidrogênio não estão proporcionalmente relacionados, como pode

ser notado pela amostra de Campo Mourão (CM) com apresentou halos médio de inibição 17,77% menor que a média do halo registrado para a amostra de Céu azul (CEU) com 75,47% de peróxido de hidrogênio da amostra CM. A amostra proveniente de Ubiratã (UBI) apresentou maior percentual de peróxido de hidrogênio com halo de inibição semelhante a amostra de Guaraqueçaba (GUA) contendo 63,48% do percentual de peróxido de hidrogênio de UBI. Para verificar a correlação do peróxido de hidrogênio na atividade antimicrobiana do mel de *T. angustula* amostrado no ensaio de sensibilidade para a leitura após 6 horas de incubação foi calculado o coeficiente de Pearson ($p < 0,05$), conforme ilustrado no Gráfico 18.

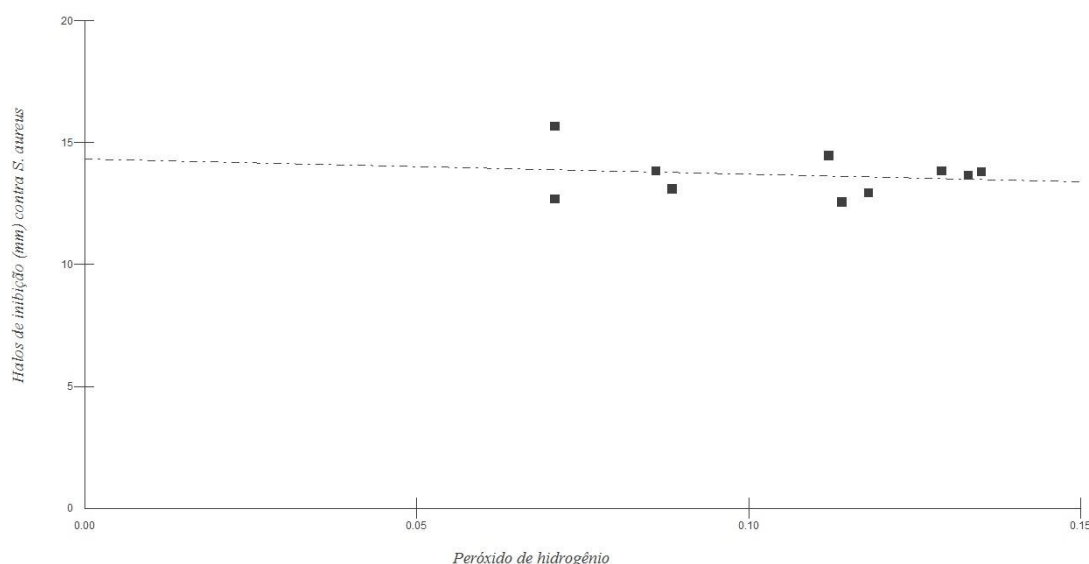


Gráfico 18 - Diagrama de correlação de Pearson entre o peróxido de hidrogênio e os halos de inibição contra bactéria *S. aureus*; [r(Pearson) = - 0,1676; (p) = 0,1143].

Conforme o coeficiente de correlação de Pearson [r(Pearson) = - 0,1676; (p) = 0,1143], evidenciam que a ação do peróxido de hidrogênio não foi determinante na atividade antimicrobiana do mel estudado. A participação do H_2O_2 na atividade antimicrobiana pode ter sido reduzido pelo fato da bactéria *S. aureus* poder produzir a enzima catalase, que destrói o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, como observado na redução nos halos de inibição para o período de 9 e 18 horas.

Os resultados obtidos sugerem que entre outros fatores podem ter contribuído para a redução do teor de peróxido de hidrogênio, como reação com o ácido ascórbico e íons

metálicos, ou pela catalase presente no néctar e pólen como cita Vargas (2006). Peralta (2010) analisando a ação do peróxido de hidrogênio constatou que este participou na atividade antimicrobiana, entretanto quando adicionado catalase na solução do mel teve sua ação reduzida propondo que metabolitos vegetais ou das abelhas pudessem estar envolvidos na atividade não peróxido. Molan (1996) considera a existência de outros fatores antimicrobianos quando o peróxido de hidrogênio é degradado pela catalase.

A variação na expressão da atividade biológica do mel tem sido atribuída não só somente ao peróxido de hidrogênio, mas a origem botânica e geográfica (WESTON; BROCKLEBANK e LU, 2000), pressão osmótica, pH, acidez, atividade de água (A_w), conteúdo de proteínas, taxa de carbono/nitrogênio, açúcares redutores, agentes químicos, substâncias voláteis (HOOPER, 1981; SNOWDON; CLIVER, 1996; WHITE, 1979; WHITE, 1989; WESTON; BROCKLEBANK; LU, 2000), flavonoides (MOLAN, 2001) e compostos fenólicos (NAMIAS, 2003). Alvarez et al. (1998) acredita, que a ação sinérgica entre os compostos pode determinar ou modificar a ação antimicrobiana do mel.

Considerando os fatores que podem contribuir com a expressão da atividade antimicrobiana do mel, devem ser estudados a fim de elucidar a contribuição de cada um na atividade antimicrobiana do mel.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de mel da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* do Estado do Paraná apresentaram atividade antimicrobiana frente à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* conforme a metodologia de disco-difusão (*in vitro*). O teste estatístico realizado com os valores dos halos de inibição, as amostras apresentam uniformidade não sendo estatisticamente diferentes. Contudo devido à variação da expressão da atividade antimicrobiana no decorrer do tempo, assinalam a importância da ampliação das análises *in vitro* e *in vivo* para uma adequada utilização do mel como produto terapêutico.

Conforme as análises dos parâmetros físico-químicos das amostras do mel de *Tetragonisca angustula*, pode-se verificar que a atual legislação brasileira com referência ao mel de *Apis mellifera*, não é adequada para todos os parâmetros analisado, apresentando valores de umidade superiores a 20%. Desta forma reforça a necessidade do desenvolvimento de um padrão para o mel de meliponíneos.

Através da metodologia empregada para quantificação do peróxido de hidrogênio detectou-se a presença desta substância nas amostras de mel amostrada, contudo a quantidade do teor não está diretamente correlacionada com os tamanhos dos halos de inibição. Ressalta-se que outros métodos analíticos devem ser empregados com o objetivo de comparação entre os valores.

Para a amostragem estudada do mel de *T. angustula* produzido no Estado do Paraná os parâmetros físico-químicos, assim como o peróxido de hidrogênio não apresentaram correlação sobre a atividade antimicrobiana, evidenciando que outros fatores podem estar envolvidos na ação biológica. Desta forma ressalta-se a importância da caracterização de outros fatores que possam influenciar na expressão da atividade antimicrobiana do mel.

REFERÊNCIAS

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKO, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Athens, Greece, v.40, p.4168-4170, 2001.

ALLEN, Klein. L.; MOLAN, Peter. C.; REID, G. M. The variability of the antibacterial activity of honey. **Apiacta**, v.26, p.14-21, 1991.

ALMEIDA, Danieli de, Espécies de abelhas (Hymenoptera Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em área de cerrado do município de Pirassununga, Estado de São Paulo. 2002. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ALMEIDA-ANACLETO, Daniela de. **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**. 2007. 133 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ALMEIDA-ANACLETO, Daniela de; SOUZA, Bruno de A.; MARCHINI, Luis C.; MORETI, Augusta C. de C. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811). **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas v. 29, n. 3, p. 535-541, jul.-set. 2009.

ALVES-FERREIRA, Bruno L. **Compostos sintéticos: Identificação da atividade antibacteriana na perspectiva de formação de nanopartículas**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

ALMEIDA-FILHO, João P. de; MACHADO, Antônio V.; ALVES, Fernanda M. S.; QUEIROGA, Kamila H. de; CÂNDIDO, Ana Flávia de M. Estudo físico-químico e de qualidade do mel de abelha comercializado no município de Pombal – PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 6, n. 3, p. 83–90, jul.-set. 2011.

AL-WAILI, Noori S., Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 7, n. 2, p. 210-222, 2004.

AMÉNDOLA, Gustavo F.; ILHA, Márcia; BERGER, Raquel; STEDILE, Rafael; SCHOSSLER, João E. Correção de defeito ósseo femural em cães utilizando implante cortical homólogo conservado em mel, **Acta Cirúrgica Brasileira**, Santa Maria, RS, v.18, n.4, p. 302-307, 2003. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0102-86502003000400008&script=sci_arttext>. Acessado em 18 dez. 2013.

ANANIAS, Karla R. **Avaliação das condições de produção e qualidade de mel de abelhas (*Apis mellifera* L.) produzido na microrregião de Pires do Rio, No Estado de Goiás**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

ANDRADE-RODRIGUES, Marcos A.; KELLER, Kelly M.; KELLER, Luiz A. M.; APARECIDA DE OLIVEIRA, Águida; XAVIER-ALMEIDA, Tatiana; MARASSI, Ana C.; KRÜGER, Celso D.; BARBOSA, Tatiana S.; LORENZON, Maria C. A.; ROSA, Carlos, A da R. Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 30, n. 4, p. 249-253, out.-dez, 2008.

ANKLAM, E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, **Food Chemistry**, Ispra, Italy, v. 63, n.4, p. 549–562, 1998.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of International**. 17^a ed. v. II., 2000.

AZEREDO, Laerte C.; AZEREDO, Maria A. A.; SOUZA, M. H. M. de; CUSTÓDIO, A. M.; TIOSSO, R. B.; SANTOS, A. L. S. dos. A relação açúcar/água e o desenvolvimento microbiano em méis de abelhas indígenas sem ferrão. In: Xii Congresso Brasileiro De Apicultura, 1998, Salvador. **Anais ...** Salvador: CBA, 1998. p. 205-206.

BAITALA, Tatiane V. **Polimorfismo molecular em populações de *Tetragonisca angustula* Latreille (Apidae; Trigonini)**. 2005. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

BATISTA DE SOUSA, Janaína M. **Perfil bromatológico de amostras de mel de abelha sem ferrão produzidas na microrregião do Seridó do Roi Grande do Norte**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Agroalimentar) - Centro de Ciências, Humanas Sociais e Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, 2011.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p.493-496, 1966.

BAZONI, Matheus de O. **Atividade antimicrobiana dos meis produzidos por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil**. 2012. 116 f. Tese (Doutorado em genético) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

BERTOLDI, Fabiano C.; REIS, Vanderlei D. A. dos; GONZAGA, Luciano V.; CONGRO, Christiane R. Caracterização físico-química e sensorial de amostras de mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) produzidas no Pantanal. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 1, p. 63-74, jan- jun. 2007.

BERTOLDI, Christiane R. C. Meliponicultura uma alternativa sustentável. **Embrapa**. 2008. Disponível em <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/agosto/2a-semana/meliponicultura-uma-alternativa-sustentavel>>. Acessado em 22 dez. 2013.

BOGDANOV, S. Antibacterial substances in honey. **Net. Bern**, Switzerland: 1997.

Disponível em

<http://www.apis.admin.ch/en/bienenprodukte/docs/honig/antibacterial_e.pdf>. Acessado em 15 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder executivo, Brasília, DF, 23 out. 2013. Seção 1 p. 16-17. Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>>. Acesso em: 30 set. 2013.

CAC - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Official methods of analysis. v. 3, Supl. 2, 1990 .

CAMARGO, R. C. R.; BRITO NETO, M. S.; RIBEIRO, J. G.; AZEVEDO, M. C.; BARRETO, A. L. H.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R. Avaliação da qualidade do mel de Jandaíra (*Melipona subnitida* DUCKE) produzido em área do Resex do delta do Parnaíba, por meio da análise físico-química. In: Congresso Brasileiro De Apicultura, 16, 2006. **Resumo expandido...** Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura, 2006. 1 CD-ROM.

CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. M. R. Meliponini, Lepetetier, 1836. In: **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. (J. S. Moure, D. Urban & G. A. R. Melo, Orgs). Curitiba, Sociedade Brasileira de Entomologia, p. 272-578, 2007.

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, p. 1-5, 2003.

CARVALHO, Carlos A. L. de; SOUZA, Bruno de A.; SODRÉ, Geni da S.; MARCHINI, Luis C.; ALVES, Rogério M. de O. **Série Meliponicultura – nº4: Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. 1. ed. Bahia: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA. 2005.

CASSETTARI, Valeria C.; STRABELLI, Tânia.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 70-76, 2005. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-86702005000100012&script=sci_abstract > . Acessado em 27 dez. 2013.

CASTANHEIRA, Eliana B. **Marcadores genéticos e sua utilização em estudos populacionais em *Tetragonisca angustula* e *Plebeia droryana* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**. 1995. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências: Genética) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1995.

CASTRO, Alene U. de. **Uso tópico do mel de abelha “*Apis mellifera*”, da oxitetraciclina e da hidrocortisona, combinadas e isoladas, na reparação de feridas cutâneas por segunda intenção, em coelhos**. 2004. 91 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant *Staphylococcus*. **Clinical Microbiology Reviews** 1 (2): p, 173-186, 1988. Disponível em < <http://cmr.asm.org/content/1/2/173.full.pdf+html>>. Acesso em 28 dez. 2013.

CHIAPETTI, Elisa; BRAGHINI, Francieli. **Comparação das características físico-químicas do mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) e abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*)**. 2013. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2013.

CHIARI, Wainer C.; ATTENCIA, Valéria M.; FRITZEN, Adriano E. de T.; TOLEDO, Vagner de A. A.; TERADA, Yoko; RUVOLO-TAKASUSUKI, Maria C. C.; TORAL, Fábio L. B.; PAIVA, Guilherme J. de. Avaliação de diferentes modelos de colmeias para abelha jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 881-887, 2002.

CORDEIRO, Mônica M. **Caracterização molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados no Hospital Municipal de Ipatinga – MG**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

CORTOPASSI-LAURINO, Marilda, GELLI D. S., Pollen Analysis: physicochemical properties and antibacterial action of brazilian honeys from africanized honeybees (*Apis mellifera* l) and stingless bees, **Apidologie**, USA, v. 22, n. 1, p. 61-73, 1991.
CRANE, Eva. **O livro do mel**. São Paulo: Editora Nobel, 1983. 225 p.

CRANE, Eva. **O livro do mel**. 2 ed. São Paulo: Nobel. 1987.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard** – Eight Edition. NCCLS document m2-A8. United States of America, Pennsylvania, 2003

DUSTMAN, J. H. (1979). Antibacterial effect of honey. **Apiacta**. 14, 7-11. EFEM, S. E. E. (1988). Clinical observations on the wound healing properties of honey. **British J Surgery**, 75, 679-681.

ESTUPIÑÁN, S.; SANJUÁN, E.; MILLÁN, R.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Parametros de calidad de la miel.II. Composición química. Revision. **Alimentaria**. p. 117-122, 1998.

EVANGELISTA-RODRIGUES, Adriana; SILVA, Eva M. S. da S.; BESSERA, Ennio M. F.; RODRIGUES, Marcelo L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166-1171, set.-out. 2005. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000500028>. Acesso em 07 dez. 2013.

FERREIRA, Eduardo A. **A oficina pedagógica como ferramenta didática para a aprendizagem em meliponicultura**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

FLORIT, Luis A. **Wasps and bees (Hymenoptera) - jataí (Tetragonisca angustula)**. 2014. Disponível em <http://luis.impa.br/photo/00_abelhas_vespas.html>. Acessado em 10 fev. 2014.

FREITAS, Breno M. **Meliponíneos**. Universidade Federal do Ceará, 2003. Disponível em <<http://www.abelhas.ufc.br/documentos/meliponineos.pdf>>. Acessado em 28 dez. 2013.

FREITAS, Geusa S. de; SOARES, Ademilson E E. **Procurando Irá: um passeio ecológico. Ribeirão Preto**: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004. 35 p. Disponível em: <<http://www.grupoabena.com.br/site/noticias/download/58/cartilha-usp-procurando-ira-58.>>. Acesso em 29 dez. 2013.

FRÍAS, I.; HARDISSON, A. Estudio de los parámetros analíticos de interés en la miel. II. Azúcares, cenizas y contenido mineral y color. **Alimentaria**, La Rioja, v.28, n. 235, p.41-43, 1992.

GARCIA-CRUZ, Crispin H.; HOFFMANN, Fernando L.; SAKANAKA, Larissa S.; VINTURIM, Tânia M. Determinação da qualidade do mel. **Alimentos e Nutrição Araraquara** - UNESP., São Paulo, 10: 23-35, 1999. Disponível em < <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/763/649>>. Acesso em 29 dez. 2013.

GEHRKE, Rafael. **Meliponicultura: O caso dos criadores de abelhas nativas sem ferrão no Vale do Rrio Rolante – RS**. 2010. 212 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural) – Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

GONÇALVES, A. L.; ALVES-FILHO A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel de abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 455-459, out.-dez., 2005.

GONNET, M.; LAVIE, E. Influence du chauffage sur le facteur antibiotique present dans les miels. **Ann. Abeille** v.3 n.4 p.349-364, 1960.

GONNET, M.; LAVIE, P.; NOGUEIRA-NETO, P. Etude de quelques caracteristiques des miels racoltés por certains Meliponínes bresiliens. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**. Paris. p. 3107-3109, 1964.

GROSSI, J. L. S. Um método alternativo para determinação de água em amostras de mel. In: Congresso Brasileiro De Apicultura, 12, Salvador, 1998. **Anais:.**, Salvador, 1998.

HOOPER, Ted. **Guia do Apicultor**. São Paulo: Europa-América, 1981, 266 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; RAMALHO, M. Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**, v.8, p.115-131, 1984.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985, v.1, 533 p.

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.

IWAMA, Satoko. **Coleta de alimentos e qualidade do mel de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae)**. 1977. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

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

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; COLETTO DA SILVA, A.; ASSIS, M. da G. P. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Revista Mensagem Doce**, n. 80, 2005. Disponível em < <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/80/biodiversidade.htm>>. Acessado em 03 jan. 2014.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha urucu: biologia, manejo e conservação**. Livre patrocínio: Fundação Banco do Brasil e Universidade Federal de Uberlândia. 2 ed. da Fundação Acangau, Belo Horizonte (MG). 1996, 143p.

KLEINERT, A. M. P.; RAMALHO, M.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; RIBEIRO, M. F.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Abelhas sociais (Bombini, Apini, Meliponini). **In: Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 371-424.

KOMATSU, Sônia S.; MARCHINI, Luís C.; MORETI, Augusta C. C.C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo, 2. Contéudo de açúcares e de proteína, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.22, n.2, p.143-146, 2002.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. A.; SCHRECKNBERGER, P. C.; WIM, W. C. Jr. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 819-828. 2001.

KURIHARA, Leonardo P., CARDOSO, Thiago M. Experiência de implantação da meliponicultura como componente agroecológico junto a comunidades ribeirinhas no baixo Rio Negro: resultados preliminares. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, 2007.

LUZ, Isabelle da S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco**.

2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008. Disponível em: <<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2008luz-is.pdf>> . Acesso em: 10 dez. 2013.

MALAGODI-BRAGA, K. S.; KLEINERT, Astrid. M. P. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be used as strawberry pollinator in greenhouses?. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, p. 771-773, 2004.

MARCHINI, Luiz C.; SODRÉ, Geni da S.; MORETI, Augusta C. de C. C. **Mel brasileiro: composição e normas**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2004. 111 p.

MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; MATOS, J. H. G.; SILVA, G. C.; PEREIRA A, J. B., Atividade antibacteriana em méis de abelhas africanizadas (*Apis mellifica*) e nativas (*Melipona scutellaris*, *M. subnitida* e *Scaptotrigona bipunctata*) no estado do Ceará, **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.52, p.50-53, 1997.

MENDES, Carolina de G.; ALVES DA SILVA, Jean B.; MESQUITA, Luciene X. de.; MARACAJÁ, Patrício B. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 07-14, abr.-jun. 2009.

MERCÊS, Manuela D.; PERALTA, Edna D.; UETANABARO, Ana P. T.; LUCCHESI, Angélica M. Atividade antimicrobiana de méis de cinco espécies de abelhas brasileiras sem ferrão. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 672-675, abr. 2013.

MERCOSUL. Grupo de Mercado comum. Resolução n. 88/99. **Regulamento técnico Mercosul: Identidade e Qualidade do Mel**. Disponível em: <[HTTP://www.mercosul.org.uy/portugues/normativa](http://www.mercosul.org.uy/portugues/normativa)>. Acesso em: 15 dez. 2013.

MIORIN, Patricia. L.; LEVY JUNIOR, Norton C.; CUSTODIO, Angela R.; BRETZ, Walter A.; MARUCCI, Maria C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Warrington, UK, v. 95, n.5, p. 913-920, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02050.x/pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2013.

MOLAN, Peter C. The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. **Bee World**, v. 73, n. 1, p. 59-76, 1992.

MOLAN, Peter C. Honey as an antimicrobial agent. In: MIZRAHI; LENSKY. **Bee Products**. New York: Penum, p. 27-37, 1996.

MOLAN, Peter. C., Potential of honey in the treatment of wounds and burns. **American Journal of Clinical Dermatology**, Wales, v.1, p. 13-19, 2001.

MOURE, Jesus S. A preliminary supra-specific classification of the Old World Meliponine bees (Hymenoptera, Apidae). **Studia Entomologica**, v. 4, p. 181-242, 1961.

NAMIAS, N., Honey in the management of infections, **Surgical Infections**, Miami, USA, v. 4, n. 2, p. 209-226, 2003.

NICOLAS-CHANOINE, Marie H. Inhibitor resistant beta-lactamases. **International Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 40, p. 1-3, 1997.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997, 446 p.

OLIVEIRA, Rosana C. de O.; NUNES, Francis de M. F.; CAMPOS, Ana P. S.; VASCONCELOS, Soraya M. de; ROUBIK, David; GOULART, Luiz R.; KERR, Warwick E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapd markers. **Genetic and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 181-186. 2004.

OLIVEIRA, Thais C.; REGINATTO, Andriago. **Inspecção da qualidade do mel de Guarapuava e região utilizando análises físico-químicas e microbiológicas**. 2004. 30 f. Relatório Final de Projeto de Pesquisa – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2004.

OSTERKAMP, Isa C. **Características polínicas e físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) e de *T. angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Trigonini) da região do Vale do Taquiri, Estado do Rio Grande do Sul**. 2009. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2009.

PAULINO; Renato de S.; MARUCCI, Maria C. Análises físico-químicas de méis do Ceará. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, 1(1): 63-78, ago-dez, 2009.

PERALTA, Edna D. **Atividade antimicrobiana e composição química de méis do Estado da Bahia**. 2010. 265 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

PIANARO, Adriana. **Ecologia química de mel de abelhas brasileiras: *Melipona rufiventris*, *Melipona scutellaris*, *Plebeia droryana*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Centris trigonoides***. 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2007.

RACOWSKI, Iliana; SILVAS, Flávia P. C.; TAKUSHI, Diana T. T.; GOMES DA SILVA, Diego W.; MIRANDA, Priscila dos S. Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado. **Revista Analytica**. n. 30, p. 106-115, ago.-set. 2007.

RAMALHO, Mauro. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Florest: a tight relationship. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, p. 37-47, 2004.

RAMALHO, Mauro; GIANNINI, T. C; MALAGODI-BRAGA, S.; IMPERATRIZ-FONSECA, Vera L. I. Pollen harvest by stingless bees foragers. **Grana** v.33 p.239-244, 1994

ROUBIK, D. W. Experimental community studies: Time-series tests competition between African and Neotropical bees. **Ecology**, Oxford, v.5, n.64, p.971-978, 1983.

SALINAS, F.; ESPINOSA-MANSILLA, A.; BERZAS-NEVADO, J. J. Flow-injection determination of HMF in honey by Winkler method. **Journal of Analytical Chemistry**, v.340, p.250-252. 1991. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00321778#page-1>>. Acessado em: 04 dez. 2013.

SANTOS, André L. dos; SANTOS, Dilvani O.; FREITAS, Cícero C. de; Ferreira, Bruno L. A.; AFONSO, Ilídio F.; RODRIGUES, Carlos R.; CASTRO, Helena C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n. 6, p. 413-423. 2007.

SANTOS, Isabel A. dos. A vida de uma abelha solitária. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 30, p. 60-62, 2002. Disponível em< <http://eco.ib.usp.br/beelab/solitarias.htm>>. Acessado em: 04 dez. 2013.

SATO, Tomoi.; MIYATA, Go. The nutraceutical benefit. Part III: Honey. **Nutrition**, New York, n.16, p.468-469, 2000.

SCHWEITZER, Monsenhor Paul. Qualidade do mel. **Revista Mensagem Doce**, 2001.

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

SILVA, Robson A. da; MAIA, Geraldo A.; SOUSA, Paulo, H. M. de; COSTA, José M. C. da; Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.17, n. 1, p. 113-120, jan.—mar., 2006.

SILVEIRA, Fernando. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002. 253 p.

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

SODRÉ, Geni da S. **Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia**. 2000. 83 f. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

SODRÉ, Geni da S.; MARCHINI, Luis C.; MORETI, Augusta C. de C. C.; OTSUK, Ivani. P.; CARVALHO, Carlos A. L. Análises multivariadas com base nas características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 11, n. 3, p. 129-137, 2003.

SODRÉ, Geni da S.; MARCHINI, Luis C. MORETI, Augusta C. de C. C.; OTSUK, Ivani P.; CARVALHO, C. A. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1139-1144, jul.-ago., 2007.

SOUZA, Bruno de 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. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SOUZA, B. de A.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M. de O.; CARVALHO, A. L. de. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Tetragonisca angustula*, provenientes das regiões do litoral norte e metropolitana do Estado da Bahia. In: Congresso Brasileiro De Apicultura, 16., Aracajú. **Anais...** Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura, 2006.

SOUZA, Bruno de A.; MARCHINI, Luis C.; DIAS, Carlos T. dos S. ODA-SOUZA, Melissa; CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, Rogério M. de O. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 798-802, jul.-dez. 2009.

SOUZA, Marshal V.; REIS, Cleômenes; PIMENTA, Fabiana C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**. Vol. 34 (1): 27-36. jan-abr. 2005.

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

SOUZA-FREITAS, Wallace E. de; AROUCHA, Edna M. M.; SOARES, Karoline M. de P.; MENDES, Francisca I. de B.; OLIVEIRA, Vianney R. de; LUCAS, Cristiane R.; SANTOS, Célia A. Praâmetros físico-químicos do mel de abelhas sem ferrão (*Melipona subnitida*) após tratamento térmico. **Acta veterinária Brasilica**, v. 4, n. 3, p. 153-157, 2010.

SPANO, N.; CASULA, L.; PANZANELLI, A.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; SCANU, R.; TAPPARO, A.; SANNA, G. An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1390-1395, 2006.

SPERANÇA, Paulo A.; GOMES, Alice da S.; PRAZERES, Claudia M. G. Sensibilidade dos *S. aureus* aos Betalactâmicos e Glicopeptídeos (“Estudo *in vitro*”). **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, Cammaragibe v. 10, n. 4, p. 39-44, out.-dez. 2010.

SPREA, Gisele. **Identificação das principais bactérias Gram negativas predominantes em fezes diarreicas de cães com gastroenterite infecciosa e sua sensibilidade e sua sensibilidade aos antimicrobianos. 2005.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/13677/TESE%20DE%20MESTRAD%20-%20GISELE.pdf?sequence=2>>. Acessado em: 12 dez. 2013.

SUBRAHMANYAM, M., Topical application of honey in treatment of burns. **British Journal of Sugery**, Maharashtra, India, v.78, n.4, p.497-498, 1991. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3188068/>>. Acessado em: 17 dez. 2013.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H.B.; LENCASTRE, H.M.; JABES, D.; MCDOUGAL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicilin-bindig proteins with modified penicilin-binding capacity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, p. 1869-1874, 1989.

VARGAS, T., **Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná.** 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) – Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

VENTURIERI, Giorgio C.; RAIOL, Vanessa de F. O.; PEREIRA, Charles A. B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança – PA, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 2. 2003. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bn/v3n2/a03v3n2.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2013.

VERISSIMO, M. T. da L **Saiba o que e HMF**. Apicultura no Brasil, São Paulo, v. 4, n. 24, 31 p., 1988.

VIDAL, R.; FREGOSI, E. V. de. **Mel: características, análises físico-químicas, adulterações e transformações**. Barretos: Instituto Tecnológico Científico “Roberto Rios”, 1984. 95 p.

VILHENA, Fabrício; ALMEIDA–MURADIAN, Lígia B. **Manual de análise físico-química de mel**. São Paulo: APACAME, p. 16, 1999.

VILLAS-BÔAS, Jerônimo. **Manual Tecnológico: Mel de abelhas sem ferrão**. (Série Manual Tecnológico). Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza – ISPN. Brasil, 2012. 96 p.

VILLAS-BÔAS, Jerônimo K.; MALASPINA, Osmar. Parâmetros físico-químicos propostos para o controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Revista Mensagem Doce**. São Paulo, n. 82, p. 6-16, 2005.

VIT, Patricia; PERSANO, Livia O. ; MARANO, Maria L.; MEJIAS, Eddy. S. de, Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties, **Apidologie**, Mérida, Venezuela, v. 29, p. 377-389, 1998. Disponível em:< http://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1998/04/Apidologie_0044-8435_1998_29_5_ART0001/Apidologie_0044-8435_1998_29_5_ART0001.html>. Acessado em: 28 dez. 2013.

VOSS, A; MILATOVIC, D.; WALLRAUCH, S.C.; ROSDAHL, V.T.; BRAVENY, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 13: 50-55, 1994.

WAHDAN, Hal A. L. Causes of the antimicrobial activity of honey. **Infection**, 26, 1998. Disponível em < <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02768748#page-1>>. Acessado em 30 nov. 2013.

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

WESTON, Roderick. J.; BROCKLEBANK, Lise K.; LU, Yinrong. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. **Food Chemistry** 2000, 70, 427-35.

WHITE, J.W. Jr. **Composition of honey**. In: CRANE, E. Honey. A comprehensive survey. London: Heinemann, p. 157-207, 1979.

WHITE, J. W. Jr. Methods for determining carbohydrates, hydroxymetilfurfural and proline in honey; collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 62, n. 3, p. 515-526, 1979.

WHITE, J. W. Jr. Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. Part II. **American Bee Journal**, Philadelphia, v.132, n.12, p.792-794, 1992.

WHITE, J. W. Jr. Honey. **Advances in Food Research**, v. 22, p. 287-374, 1978.

WHITE, J. W. Jr.; SUBERS, M. H.; SCHEPARTZ, 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**, n.73, p.57-70, 1963.

ZEIL, Jochen; WITTMANN, Dieter. Visually controlled station keeping by hovering guard bees of *Trigona (Tetragonisca angustula)*. **Journal Comparative Physiology – Part A**. v.165, p. 711-718. 1989. Disponível em: <
<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00611002#page-1>>. Acesso em: 05 dez. 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Médias de triplicatas (\pm desvio padrão) dos resultados obtidos para os parâmetros acidez, hidroximetilfurfural, pH e umidade das amostras de mel de abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) coletadas entre setembro/2012 e julho/2013 no Estado do Paraná (PR).

Parâmetro	Amostra de mel de <i>Tetragonisca angustula</i>									
	CM	CÉU	GUA	MAN-B	MAN-M	MGA	ORT	SC	SH	UBI
Acidez (meq.kg ⁻¹)	26,33 \pm 2,17	27,80 \pm 1,45	32,46 \pm 2,04 a	27,76 \pm 1,66	24,66 \pm 1,52	28,30 \pm 1,00	33,46 \pm 3,04 m	34,30 \pm 1,22 s	21,20 \pm 0,85 ams	24,10 \pm 1,55
HMF ¹ (mg.kg ⁻¹)	16,56 \pm 0,86	4,20 \pm 0,50	18,22 \pm 1,79	26,78 \pm 1,74 kp	2,27 \pm 0,15 k	16,75 \pm 1,05	14,40 \pm 1,08	3,11 \pm 0,24 p	17,67 \pm 0,66	14,41 \pm 1,48
pH	3,09 \pm 0,03	3,11 \pm 0,05	3,97 \pm 0,03 w	3,93 \pm 0,01	3,86 \pm 0,07	2,84 \pm 0,04 wg	3,03 \pm 0,03	4,02 \pm 0,02 g	3,06 \pm 0,02	3,02 \pm 0,02
Umidade (%)	25,64 \pm 0,48	25,64 \pm 0,48	22,78 \pm 3,46 h	23,98 \pm 1,42	26,95 \pm 4,40	26,03 \pm 0,81	17,66 \pm 2,57 c	24,54 \pm 6,53 q	23,86 \pm 1,61 hcq	30,65 \pm 2,68

¹Hidroximetilfurfural. Valores na mesma linha seguidos de letras iguais são significativamente diferentes [Kruskal-Wallis, seguido de teste *a posteriori* de Dunnett ($p < 0,05$)].