



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES
MÉIS DE ABELHA SEM FERRÃO**

THAISA FRANCIELLE TOPOLSKI PAVAN BATISTON

CHAPECÓ, 2017

THAISA FRANCIELLE TOPOLSKI PAVAN BATISTON

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES MÉIS DE ABELHA SEM
FERRÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Nunes Araújo

**Chapecó, SC, Brasil
2017**

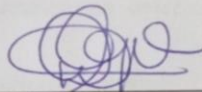
Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

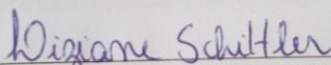
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES MÉIS DE ABELHA SEM
FERRÃO**

Elaborada por
Thaís Francielle Topolski Pavan Batiston
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

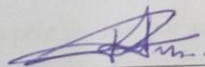
Comissão Examinadora:



Prof^ª. Dra Denise Nunes Araujo - UDESC



Prof^ª. Dra Liziane Schittle - UDESC



Prof^º. Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes - UDESC

Chapecó, 02 de agosto de 2017.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora a Professora Dra. Denise Nunes Araújo, pela grande oportunidade de realizar um trabalho gratificante, aprendi muito com nossas conversas, muito obrigado!

Aos Professores e colegas de profissão que me acompanharam durante o desenvolvimento desta pesquisa, mas principalmente às Professoras Lenita, Maira e Luciola, muito obrigado!

Aos Laboratórios de Nutrição Aninal (LANA),

ao Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia,

ao Laboratório de Solos

por ceder suas estruturas no desenvolvimento desta pesquisa!

Aos amigos meliponicultores pelo amor às abelhas sem ferrão e por ceder

gentilmente as amostras para este trabalho: Flávio, Cléber, Sr. Deitos, Gilmar, Oldenir, e

aos queridos amigos de profissão os Zootecnistas Vitor e Lenilson.

Obrigado pelo apoio e por acreditar neste projeto!!

À minha família em especial pelo apoio incondicional!

Ao Eduardo, pelo carinho, companheirismo!!

À Helena, minha pequena menina que adora mel de abelha sem ferrão!!

Enfim, gostaria de agradecer a todos que de forma direta e indireta puderam contribuir para a realização deste trabalho!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES MÉIS DE ABELHA SEM FERRÃO

AUTORA: Thaisa Francielle Topolski Pavan Batiston

ORIENTADORA: Prof. Dra. Denise Nunes Araujo

Chapecó, 02 de agosto de 2017

Nos últimos anos, o perfil de resistência bacteriana vem sendo agravado pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal e saúde humana. Frente a esse paradigma, houve a necessidade de buscar novas alternativas de terapias onde os antimicrobianos não conseguem atuar pela falta de susceptibilidade de diversos microrganismos. Os produtos naturais como o mel têm sido utilizados pela medicina popular para diferentes propósitos, devido a suas propriedades terapêuticas, dentre elas a antimicrobiana. Entretanto, diante da variedade de espécies de abelhas produtoras de mel, existem particularidades que permanecem desconhecidas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos e a atividade antimicrobiana de diferentes méis de abelhas sem ferrão frente a cepas de isolados bacterianos (*Salmonella Heidelberg*, a *Salmonella Enteritidis*) e cepas de referência bacteriana (*Salmonella typhimurim* ATCC 14028 e a *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Em relação aos parâmetros físico-químicos foram avaliados sete méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão sendo eles: *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona mondury*, *Melipona bicolor*, *Melipona marginata*, *Tetragona clavipes* e *Scaptotrigona bipunctata*. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH, umidade, atividade da água, acidez, cinzas, condutividade elétrica e cor. A atividade antimicrobiana das bactérias foram determinadas através de ensaios de difusão em ágar e concentração mínima inibitória com os méis de *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* e *Melipona bicolor*. Para a técnica de difusão em ágar e concentração mínima inibitória, as amostras de mel foram utilizadas nas concentrações 100%, 75%, 50%, 37,5% e 25%. A concentração mínima inibitória de 25% de mel foi capaz de inibir o crescimento tanto os isolados bacterianos como as cepas de referência bacterianas. Todos os méis apresentaram atividade antimicrobiana em todos os ensaios aplicados. Portanto, concluímos que o mel é uma alternativa promissora capaz de sensibilizar microrganismos, não só para a saúde humana, mas também para a saúde animal.

Além disso, é necessário entender a importância dos parâmetros físicoquímicos para buscar um padrão adequado para abelhas sem ferrão.

Palavras-chave: Antibiograma, qualidade, meliponíneos, sensibilidade, antibióticos.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Universidade do Estado de Santa Catarina

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF DIFERENT HONEYS FROM STINGLESS HONEYBEES

AUTHOR: Thaisa Francielle Topolski Pavan Batiston

ADVISER: Prof. Dra. Denise Nunes Araujo

Chapecó, August 02st, 2017

In the last years, the bacterial profile resistance have been aggravate by indiscriminate use of antimicrobials in animal production and human health. By the way, new alternatives of therapies are necessary were antimicrobials cannot act due to lack of susceptibility from microorganisms. Natural products as honey have been used in popular medicine with different purposes, due to his therapeutic properties like antimicrobial capacity. However, there are many particularities that remain unknown because of diversity of stingless honeybees. The aim of this study was to evaluate physical and chemical parameters and antimicrobial activity of different honeys from stingless honeybees, against two bacterial isolates: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Enteritidis, and three reference strains: *Salmonella typhimurim* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Regarding the physicochemical parameters were evaluated seven honeys of different species of stingless bees which are: *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona mondury*, *Melipona bicolor*, *Melipona marginata*, *Tetragona clavipes* e *Scaptotrigona bipunctata*. Physicochemical parameters evaluated were pH, moisture, water activity, acidity, ash, electrical conductivity and color. Antimicrobial activity of the bacteria was determined by means of diffusion tests in agar and minimum inhibitory concentration with the honeys of *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* and *Melipona bicolor*. For agar well diffusion and minimal inhibitory concentration, it was used honey sample in different concentrations, 100%, 75%, 50%, 37.5% and 25%. Results from physicochemical analysis showed a significative difference between types of honey. Ashes contente, moisture contente and acidity found are above the limits standardized by Brazilian legislation. Minimal inhibitory concentration of 25% from honey was able to inhibit the growth of both bacterial isolates and bacterial reference strains. All honeys shown antimicrobial activity for all tests applied. Therefore, we conclude that honey is a promising alternative capable of sensitizing microorganisms, not only for human health, but also for animal health. As well it is necessary to understand the importance of the physicochemical parameters to search for a suitable pattern to stingless bees.

Keywords: Antibiogram, quality, meliponinae, resistance, antibiotics.

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	1
REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 MELIPONICULTURA	1
1.1.1 Abelha sem Ferrão	1
1.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	9
1.3 OBJETIVOS	14
1.3.1 Objetivo geral	14
1.3.2 Objetivos específicos	14
2. CAPÍTULO II	15
ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF HONEYS FROM STINGLESS BEES	16
ABSTRACT	17
INTRODUCTION	19
MATERIALS AND METHODS	20
RESULTS	22
DISCUSSION	23
CONCLUSIONS	25
ACKNOWLEDGEMENTS	26
REFERENCES	26
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE DIFERENTES MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO	34
RESUMO	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	43
AGRADECIMENTOS	43
ABSTRACT	44
BIBLIOGRAFIA CITADA	45

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE <i>MELIPONA BICOLOR</i>	49
RESUMO	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	56
AGRADECIMENTOS	56
ABSTRACT	56
BIBLIOGRAFIA CITADA	57
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 MELIPONICULTURA

1.1.1 Abelha sem Ferrão

As abelhas sem ferrão estão intimamente ligadas com as regiões tropicais do planeta, onde possuem maior diversidade e abundância (DE CAMARGO e MENEZES-PEDRO, 1992; MICHENER, 2007). Estas abelhas são nativas da América Central e do Sul, África, Ásia e nordeste da Austrália (CRANE, 1990; MICHENER et al., 2013; CHUTTONG et al., 2016).

No Brasil são encontradas as abelhas da família Meliponinae, popularmente conhecidas como abelhas indígenas ou abelhas sem-ferrão. Esta família compreende mais de 200 espécies diferentes, muitas frequentemente criadas para a produção de mel (KERR, 1987). Assim como as abelhas com ferrão, as abelhas sem ferrão nativas são insetos sociais e produtoras de mel (SOUZA et al., 2006; MICHENER et al., 2013).

Tais abelhas estão classificadas como subfamília *Meliponinae* spp., e possuem 3 tribos com hábitos completamente distintos: *Meliponini*, *Trigonini* e *Lestrimelittini*. Cada espécie possui característica própria de elaboração dos favos (potes) para armazenar o mel, coletam o néctar de plantas, apresentando vôos mais curtos em busca de alimento, dispendo naturalmente a colméia em sentido horizontal (CRANE, 1990, NOGUEIRA-NETO, 1997; OLIVEIRA e SANTOS, 2011; VILLAS-BÔAS, 2012, BILUCA, 2014).

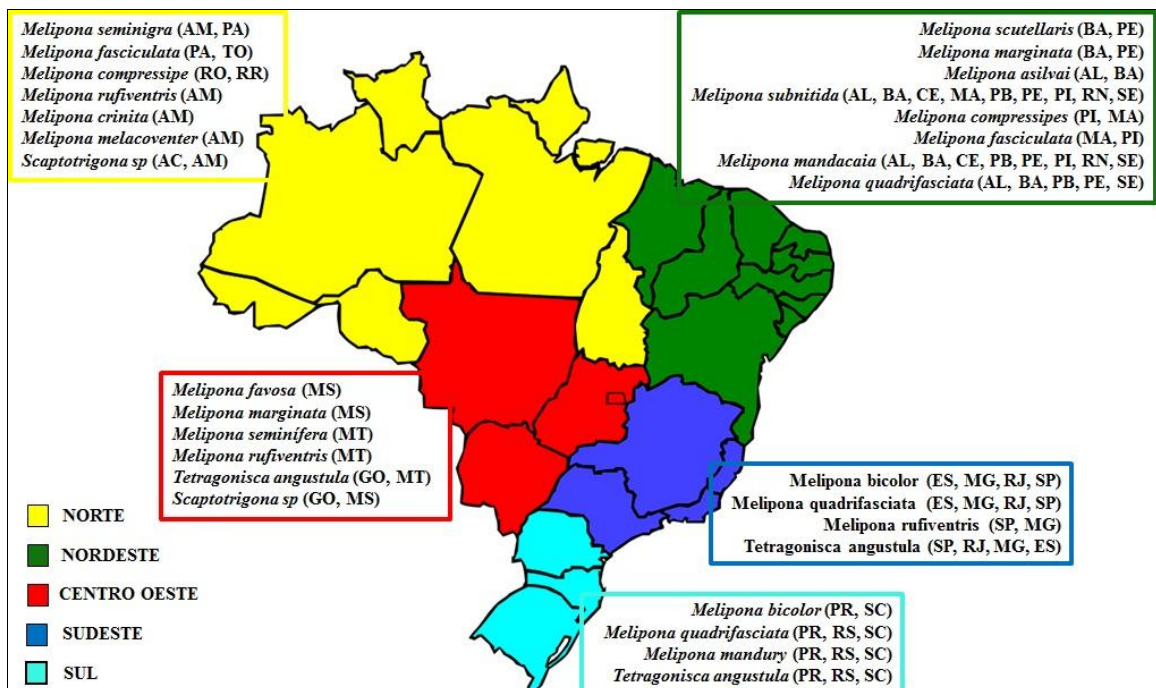
As abelhas sem ferrão possuem características de ferrão atrofiado e comportamento altamente eussocial, ou seja, divisão de trabalho bem definidas como o sistema de castas, o cuidado com a prole e as diferenças morfológicas que são caracterizadas pela sobreposição de gerações (MICHENER, 2007). Além disso, contribuem com a polinização, realizando um importante papel ecológico e econômico (NOGUEIRA-NETO, 1997; BARTH, 2004).

Por se tratar de abelhas nativas adaptadas geograficamente à regionalidade do clima e da alimentação, caracterizam-se por serem animais silvestres, nativos do território brasileiro e,

como muitos outros animais, possuem uma resolução do Conama nº 346, de 16 de agosto de 2004 que prevê o registro do meliponicultor e o transporte das espécies para fora de suas respectivas áreas de distribuição geográfica original que deverá ocorrer mediante autorização deste órgão, excepcionalmente para fins científicos ou conservacionistas. Meliponicultores que mantenham menos de cinquenta colméias de abelhas nativas são dispensados deste registro (BRASIL, 2004)

Dentre as regiões brasileiras, a região amazônica é onde se encontra a maior quantidade de espécies em função da abundância na disponibilidade de alimento (VILLAS-BÔAS, 2012). As espécies que podem ser naturalmente encontradas na região sul do Brasil são a *Melipona bicolor* (Garupú ou Guaraípo), a *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia), a *Melipona mondury* (Monduri) e a *Tetragonisca angustula* (Jataí) (VILLAS-BÔAS, 2012) (Figura 1).

Figura 1 Mapa do Brasil com as principais espécies de abelha sem ferrão (Meliponinae spp.) criadas em diferentes regiões do país.



Fonte: adaptado de VILLAS-BÔAS (2012).

Na meliponicultura brasileira não há um censo oficial sobre o número de colônias mantidas em caixas e estimativas da produção de mel (SOUZA, 2008; JAFFÉ et al., 2015). O sistema de produção não tem gestão padronizada e o conhecimento técnico é escasso, sendo caracterizada como uma atividade essencialmente informal, com diversas motivações,

incluindo conservação de espécies nativas, interesse para produção de mel e como animais de estimação (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; SOUZA, 2008; JAFFÉ et al., 2015).

1.1.2 Características de identidade e qualidade

As características físico-químicas, microbiológicas e polínicas do mel produzido pelas abelhas sem ferrão ainda são pouco conhecidas. A variação na composição do mel é ocasionada pelas diferenças no comportamento de coleta das abelhas, relacionando-se de acordo com a fonte de coleta, néctar ou melato (GAITANIS et al., 2012).

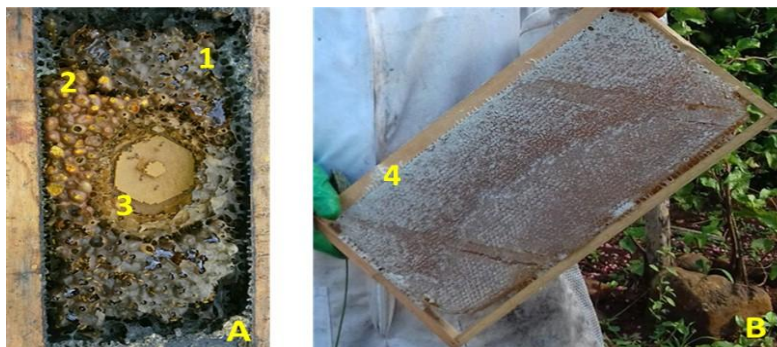
A composição do mel varia de acordo com a espécie de abelha que o produz, da fonte nutricional, de variações no teor de néctar, das condições geográficas e climáticas, bem como do manejo do meliponicultor (LIBERATO, et al., 2013; HABIB et al., 2014; LAALLAM et al., 2015; CHUTTONG et al., 2016; KIVRAK et al., 2017).

Em relação ao gênero *Apis*, a produção de mel de abelhas sem ferrão é relativamente menor, grande parte em função de que a meliponicultura é sub-explorada, ou seja, a demanda excede a oferta (JAFFÉ et al., 2015, CHUTTONG et al., 2016).

Um fator interessante sobre as abelhas sem ferrão é que elas diferem das abelhas do gênero *Apis* no que se refere à forma de armazenamento do mel. O mel é armazenado em potes de cerume, que são feitos de cera e própolis (BALLIVIÁN, 2008) (Figura 2), enquanto a *Apis* armazena o mel em favos compostos apenas por cera (PERSADONO-ODDO et al., 2008).

O processo de elaboração do mel para abelhas sem ferrão e *Apis mellifera* é o mesmo, neste processo existem reações que modificam o néctar coletado em duas etapas. A primeira é uma reação física pela desidratação, com a eliminação da água dentro dos favos na colmeia e a absorção no papo; a segunda equivale a reações químicas pela ação de diferentes enzimas responsáveis pela inversão da molécula de sacarose em moléculas menores, principalmente em glicose e frutose (CRANE, 1987; LENGLER, 2002).

Figura 2 Diferenças no armazenamento de mel de *Tetragonisca angustula* (A) com potes de mel (1), potes de pólen (2) e discos de cria (3) comparado com um quadro de favos de mel de *Apis mellifera* (B) (4).



Fonte: do autor, (2016).

Devido à falta de conhecimento sobre o produto mel de abelhas sem ferrão, este não encontra-se incluído nos padrões nacionais e internacionais de qualidade do mel (BRASIL, 2000; CODEX, 2001). No entanto, a Comissão Internacional do Mel está buscando estabelecer padrões de qualidade de produtos de abelhas que atendam as espécies melíferas, incluindo as abelhas sem ferrão (SOUZA, 2008; JAFFÉ et al., 2015).

De acordo com a Instrução Normativa nº 11 (BRASIL, 2000) e o Codex Alimentarius (2001), o mel é definido como substância natural produzida pelas abelhas melíferas a partir do néctar das plantas, de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insectos sugadores que ficam sobre as partes vivas de plantas. As abelhas recolhem, transformam e combinam com substâncias específicas próprias, armazenando e deixando no favo para amadurecer.

A classificação do mel é feita de acordo com sua origem, podendo ser de fontes florais ou extra-florais (de melato). O mel floral é obtido dos néctares das flores e pode ser classificado em monofloral e multifloral. Monofloral é o mel originado de flores da mesma família ou espécie. O mel multifloral é composto de diferentes origens florais, enquanto o mel de melato é obtido principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores que se encontram sobre elas (BRASIL, 2000), sendo comum encontrar o mel de flores misturado ao mel de melato.

a) Parâmetros de qualidade:

Méis de abelhas sem ferrão podem apresentar uma grande variação no conteúdo de açúcares redutores, com valores inferiores aos exigidos pela legislação brasileira baseada nos méis de *Apis mellifera* (Tabela 1), bem como o teor de umidade que é característico segundo cada espécie de abelha sem ferrão (OLIVEIRA e SANTOS, 2011).

Tabela 1 Parâmetros de identidade estabelecidos pela Legislação Brasileira e do Codex Alimentarius para o mel de *Apis mellifera*

Parâmetros	Brasil (2000)	Codex Alimentarius (2001)
Umidade (% m/m)	Máx. 20	Máx. 20
HMF (mg kg ⁻¹)	Máx. 60	Máx. 80 em regiões tropicais
Atividade Diastásica (Göete)	Min 8	Mín. 8
Açúcares Redutores (% m/m)	Min 65	Mín. 60
Sacarose (% m/m)	Máx. 6	Máx. 5
Cinzas (5 m/m)	Máx. 0,6	-
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	-	Máx 800
Acidez (meq kg ⁻¹)	Máx. 50	Máx. 50
Cor	Quase incolor a pardo-escuro	Incolor a pardo-escuro

Fonte: BRASIL (2000); Codex Alimentarius (2001).

a.1) Grau Brix e Teor de Umidade:

Dentre os parâmetros de qualidade, o grau Brix (°Brix) é um parâmetro que indica a quantidade, em gramas, dos sólidos que se encontram dissolvidos na água de um alimento (USMAN et al., 2011). Existe uma correlação negativa entre o grau Brix e o teor de umidade no mel. Assim, o menor teor de sólidos solúveis em méis de *Melipona* pode estar relacionado com um conteúdo de água mais elevado (SOUSA et al., 2016).

Sousa et al. (2016) encontraram variação no °Brix de 71,1 a 74,4 nos méis de abelha sem ferrão avaliados e não observaram diferenças significativas em relação a fonte floral. Campos et al. (2010) observaram uma média de 72 °Brix para a abelha sem ferrão Uruçu na Paraíba. Em outro estudo com mel de espécies de abelhas sem ferrão originárias da América do Sul foram encontradas concentrações que variaram entre 57,5 e 75 °Brix (SOUZA et al., 2006).

O mel possui é higroscópico, ou seja, tem a capacidade de absorver a umidade do ambiente. O teor de umidade do mel pode afetar diretamente a maturidade, a viscosidade, a cristalização e inclusive facilitando os processos microbiológicos como a fermentação indesejável dos açúcares pelas leveduras (RIBEIRO et al., 2009; KUROISHI et al., 2012).

Souza et al. (2004), observaram uma concentração média de umidade na ordem de 28,6±4,6%, sendo o maior percentual constatado na espécie *Melipona compressis* de

34,6±0,5% e a menor concentração foi obtida em amostras de mel da espécie *Melipona rufiventris* com 23,9±0,6% de umidade. Já no estudo de Suntiparapop et al. (2012) para a abelha sem ferrão *Tetragonula laeviceps* na Tailândia, encontraram uma concentração média de 26.98 ± 0.23% para a umidade.

Normalmente o que se encontra de valores de umidade para abelhas sem ferrão é de 22,30 a 34,10 %, e mesmo em clima seco o teor de umidade difere-se do mel de *Apis mellifera* (ALVES et al., 2005; VILAS-BOAS et al., 2012; SILVA et al. 2013).

a.2) Atividade de água:

A presença de água no mel está relacionada com a origem floral, origem geográfica, condições climáticas e a estação do ano em que é realizada a colheita. (FEÁS et al., 2010; ÖZCAN e ÖLMEZ, 2014; VIEIRA et al., 2014).

A atividade de água (A_w) é uma medida pouco avaliada em méis porém a sua relevância se deve por ser o principal componente de muitos alimentos e influenciar a sua estabilidade química, enzimática e favorecer o crescimento microbiano (HOFFMANN, 2001). Para méis extraflorais, pode-se encontrar atividade de água entre 0,483 a 0,591, enquanto que para méis florais de 0,479 a 0,557 (ABRAMOVIC et al., 2008). No estudo realizado por Anacleto et al. (2009) a variação foi entre 0,59 e 0,82. Já os valores de atividade de água que Almeida-Muradian et al. (2007) encontraram situavam-se entre 0,74 a 0,76.

a.3) Acidez livre e pH:

O mel não deve apresentar quaisquer indícios de fermentação (BRASIL, 2000). A presença de microrganismos nos potes de mel se deve ao contato dos corpos das abelhas com o ambiente de coleta de alimentos, tornando o mel um alimento suscetível a contaminação por fungos filamentosos, leveduras e bactérias (RIBEIRO et al., 2009; SAXENA et al., 2010).

A fermentação do mel é observada pelos valores de acidez livre (máxima de 50 meqkg⁻¹), não se tem uma determinação para méis de abelha sem ferrão, a acidez livre é muito variável, chegando a valores de 5,1 a 168 meqkg⁻¹ (OLIVEIRA e SANTOS, 2011).

A acidez tem origem pela presença de diferentes ácidos orgânicos e também de alguns íons inorgânicos, tais como o fosfato, provenientes de diferentes fontes de néctar. O ácido

glucônico, por exemplo está presente no mel através da reação enzimática da glicose-oxidase sobre a glicose. Em geral a presença destes ácidos quando em solução aquosa, produzem íons de hidrogênio que promovem acidez ativa que está relacionada com a atividade antimicrobiana do mel (BOGDANOV, 1997; PERALTA, 2010; GOIS et al., 2013).

Além da acidez, o pH também é considerado um agente antimicrobiano e os dois provêm maior estabilidade ao mel em relação ao desenvolvimento de microrganismos (PEREIRA, 2010 dissertação). Não há na legislação valores de referência para o pH, mas considera-se ideal que este deva ser inferior a 4,0, uma vez que a maioria das bactérias preferem um ambiente neutro a levemente alcalino. (BRASIL, 2000; PEREIRA, 2010).

Boorn et al. (2010) estudando as propriedades físico-químicas das amostras de mel de abelhas sem ferrão encontraram um pH médio de 3,85. Sousa et al. (2016) observaram variação significativa entre méis de diferentes fontes florais e espécies de abelhas, os valores de pH encontrados variaram entre 3,1 a 5,3.

Os valores de pH são influenciados pela coleta de alimento, solo e por ácidos orgânicos, alguns voláteis e outros inorgânicos (BAZONI, 2012). E estes fatores influenciam diretamente na capacidade de formação de hidroximetilfurfural (SILVA et al., 2004; MENDES et al., 2009).

a.4) Hidroximetilfurfural:

O hidroximetilfurfural (HMF) é um composto furânico formado pela decomposição de monossacarídeos ou pela reação de Maillard; o teor máximo de hidroximetilfurfural permitido pela legislação brasileira é de 60 mg.kg⁻¹, sendo utilizado como indicativo de deterioração do mel (BRASIL, 2000; TOSI et al. 2004).

Os valores de hidroximetilfurfural apresentam variações em cada estudo; para Anacleto et al. (2009), foi verificado uma variação de 0,75 a 30,58 mg.kg⁻¹ para méis da espécie *Tetragonisca angustula*. Torres et al. (2004), para a mesma espécie, encontraram valor médio de 10,3 mg.kg⁻¹. Almeida –Muradian et al. (2013) observaram no seu estudo um teor de 7,56 mg.kg⁻¹ para *Melipona subnitida*.

Na presença de alta acidez e da atividade de água, a velocidade de reação de Maillard é retardada e a formação de HMF acaba diminuindo. O mel de abelhas sem ferrão tem maior atividade de água e acidez em comparação aos méis de *Apis melliferas*, o que pode justificar o teor de HMF reduzido no mel de abelhas sem ferrão (BILUCA, 2014).

a.5) Condutividade elétrica e teor de cinzas:

A condutividade elétrica do mel permite auxiliar em sua caracterização, diferenciando-os em méis florais ou extraflorais. É um parâmetro que depende dos ácidos orgânicos, dos sais minerais e outras substâncias (RICHTER et al., 2011; KOWALSKI et al. 2013). Os valores de condutividade elétrica para *Tetragonisca angustula* descrita por Anacleto et al. (2009) apresentaram variação de 1061 a 2700 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, demonstrando que a origem do mel pode ser extrafloral, ao contrário do que foi encontrado por Almeida-Muradian et al. (2013) para *Melipona subnitida* de 102,77 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Segundo Bogdanov e Martin (2002), sua determinação pode substituir a análise de teor de cinzas, pois apresenta um valor máximo para méis de origem floral de até 800 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, e valores superiores a este indica que o mel pode não ser de origem floral. Os teores de cinzas constituem-se de, principalmente, sais de cálcio, sódio, potássio, magnésio, ferro, cloro, fósforo, enxofre e iodo, e a porcentagem total dos elementos minerais (cinza total) varia de 0,02 a 0,6% do mel (BRASIL, 2000; STRAMM, 2011). Estes componentes encontrados no mel podem ser modificados por fatores relacionados às abelhas, ao manejo, clima, solo e origem botânica (BOGDANOV e MARTIN, 2002).

Além disso, os minerais influenciam na coloração do mel, estando presente em maior concentração nos méis escuros em comparação com os claros (STRAMM, 2011; ALQARNI et al., 2014), com percentual variando entre 0,21 a 0,60% para a espécie *Tetragonisca angustula* (ANACLETO et al., 2009).

a.6) Cor:

A cor do mel é um parâmetro variável e está associada principalmente à sua origem floral, e aos minerais presentes; entretanto, o armazenamento prolongado, a luz, e as possíveis reações enzimáticas podem acabar por escurecer o mel (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010, DA SILVA et al., 2016; SOUSA et al., 2016).

A intensidade da cor do mel reflete no seu teor de compostos fenólicos totais e pode ser correlacionada com a sua atividade antioxidante (GÁMBARO et al., 2007; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010, DA SILVA et al., 2016).

A legislação exige que os parâmetros de identidade e qualidade das abelhas sem ferrão sejam associadas às características do mel de *Apis mellifera*. No entanto, essas características possuem algumas peculiaridades conferindo sabores e aromas diferenciados além de uma

textura mais fluida. A ação antimicrobiana destes méis é naturalmente o resultado de suas características distintas, e o estudo e a compreensão destas se tornam importante para que seja possível o aproveitamento de sua atividade biológica.

Méis de juazeiros, produzidos tanto pela abelha sem ferrão Jandaíra quanto pela Uruçu, exibiram uma coloração mais escura classificada como âmbar em relação a outras fontes florais como malícia, velame branco e jurema branco (SOUSA et al., 2016). Em outro estudo com a abelha Jandaíra, Almeida-Muradian et al. (2013) observaram que a classificação da cor do mel encontrada era extra-branco e branco.

1.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O mel é um produto natural nutritivo que consiste de uma solução altamente concentrada e complexa de açúcares. Possui pequenas quantidades de outros constituintes, como minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonóides, compostos fenólicos, enzimas, e outros fitoquímicos que contribuem para seus efeitos antioxidantes, além de pigmentos e substâncias aromáticas (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; KHALIL et al., 2011).

A quantidade desses componentes e o seu potencial antimicrobiano estão relacionados com a localização geográfica, com as condições climáticas, e com a variação da fonte nutricional da colméia durante as estações do ano (MAVRIC et al., 2008; SHERLOCK et al., 2010; KWAKMAN et al., 2011; HUSSAIN et al., 2015; LAALLAM et al., 2015; NISHIO et al., 2016; EKHTELAT, et al., 2016; WASFI et al., 2016). Além disso, o processamento, manuseio e armazenamento do mel podem influenciar na sua composição (SHERLOCK et al., 2010; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; NISHIO et al., 2016).

Na medicina tradicional mundial, o mel é reconhecido por ter propriedades medicinais e seu consumo pode ser relacionado com o seu valor terapêutico (VENTURINI et al., 2007; MORAIS, 2008; LIBONATTI et al., 2014). Gregos e Egípcios aplicavam mel topicamente em feridas e queimaduras de pele; registros obtidos em documentos persas corroboram com a eficácia do mel no tratamento de feridas, eczemas e inflamações (ETERAF-OSKOU EI e NJAFI, 2013; SEPEHR, 2010). Na era cristã, Celsius afirmava que o mel possuía propriedades aglutinantes sobre os ferimentos (SILVA et al., 2006).

Em 1800, cientistas divulgaram a habilidade do mel em eliminar microrganismos causadores de doenças; entretanto, o surgimento de antibióticos por volta de 1900, fez

diminuir o interesse científico pelo mel (MOLAN, 2001).

No Brasil é muito comum o uso de fitoterápicos e xaropes caseiros com o uso do mel em terapias populares, principalmente por indígenas e nas zonas rurais, pela crença que este tipo de mel possui propriedades curativas (POSEY, 1987; CORTOPASSI-LAURINO e GELLI, 1991; MADALENO, 2015).

Atualmente, em função da preocupação generalizada pela crescente emergência de patógenos resistentes, o mel vem tendo destaque por ter sido identificado como uma alternativa aos antimicrobianos contra microrganismos resistentes à antibióticos, principalmente por ser um produto natural (BOORN et al. 2010; PIMENTEL et al., 2013; CAMPEAU e PATEL, 2014).

As propriedades físico-químicas do mel atribuem a ele a capacidade de inibir o crescimento bacteriano apenas quando está livre de contaminações (GONSALVES, 2004; VENTURINI et al., 2007). O mel apresenta, além da propriedade antimicrobiana, propriedades antifúngicas, antioxidantes, antiviral, antiparasitária, anti-inflamatória, imunossupressora (IRISH et al., 2006; BOGDANOV et al., 2008; ALVAREZ-SUARES et al., 2010), e cicatrizantes (KUMAR et al., 1993; MACLOONE et al., 2016). De acordo com Temaru et al. (2007), existe grande probabilidade de que constituintes fitoquímicos de própolis sejam difundidos no mel durante o período em que este fica armazenado nos potes de cerume (na colméia), conferindo-lhe propriedades antimicrobianas.

Diante deste contexto, muitos estudos vem buscando identificar o potencial antimicrobiano de méis de diferentes espécies de abelhas melíferas, na utilização da prática clínica devido a sua atividade antimicrobiana que é praticamente inexplorada (MAVRIC et al., 2008; ETERAF-OSKOU EI et al., 2013, CHUTTONG et al., 2016;).

O MediHoney é um mel artificial que é comercializado por apresentar alta atividade antibacteriana. Sua composição é um mix de diferentes méis, com procedência de origem monofloral da espécie de planta nativa chamada de *Leptospermum* spp. produzido na Austrália (SIMON et al., 2008). Este produto surgiu através do desenvolvimento de pesquisas da utilização do mel em diferentes tipos de terapêutica (SIMON et al., 2008; MULLER et al., 2013; MACLOONE et al., 2016). O MediHoney é um produto medicinal certificado pela União Européia; os países que possuem licença de uso deste produto são os Estados Unidos, Austrália e a Europa. (SIMON et al., 2008). A Sudoeste da Austrália e Nova Zelândia, a planta nativa *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) é muito visitada por abelhas melíferas do gênero *Apis*, (RABIE et al., 2016). O mel produzido com maior predominância desta planta nativa, possui maior atividade antimicrobiana descrita como “fator único Manuka” (UMF).

Este fator único Manuka caracteriza-se por um alto nível de constituintes não peroxidantes, pela presença de dihidroxiacetona, Leptosperina e quantidades variáveis de methylglioxal (MGO) (MAVRIC et al., 2008; AHMED e OTHMAN, 2013; RABIE et al., 2016).

Outra variedade de mel encontrada é o mel de Tualang, que é produzido pela espécie *Apis dorsata* na Malásia. Este mel é caracterizado por ser monofloral com predominância da planta *Koompassia excelsa* (Fabaceae), esta espécie de planta também é conhecida como árvore de Tualang, sendo encontrada na região nordeste das florestas tropicais da Malásia (AHMED e OTHMAN, 2013; DEVASVARAN e YONG, 2016; SHEHU et al., 2016).

Nos estudos realizados por Kishore et al. (2011) e Khalil et al. (2012), o mel de Tualang apresentou um maior teor de ácido fenólico, flavonóides e ácido ascórbico, característica que intensificou a sua atividade antioxidante. A cor escura do mel de Tualang, segundo Kek et al. (2014), também estaria relacionada ao maior conteúdo fenólico total, com pH variando entre 3,2 e 4 e umidade reduzida, tornando-o adequado para ser utilizado em distúrbios da pele, como as feridas.

Apesar de todo o potencial que o mel brasileiro apresenta, os dados sobre as propriedades antimicrobianas ainda são limitados (NISHIO et al., 2014; BUENO-COSTA et al., 2016). Levando-se em consideração a diversidade de espécies botânicas e de abelhas sem ferrão existentes, muitos tipos de méis ainda não foram investigados (BALLIVIÁN, 2008).

Os fatores que estão relacionados com este poder de ação antimicrobiana ainda permanecem desconhecidos e, devido a isso, muitos estudos estão sendo realizados para verificar o comportamento dos microrganismos frente aos diferentes tipos de méis, considerando não apenas as espécies de abelhas melíferas como também a origem alimentar e seus constituintes (MAVRIC et al., 2008; NISHIO et al., 2014; DEVESVARAN e YONG, 2016; BUENO-COSTA et al., 2016; DASH et al., 2016; CHUTTONG et al., 2016).

Diversos tipos de mel já demonstraram sua eficácia contra diferentes tipos de microrganismos, como por exemplo, bactérias multiresistentes a antibióticos. Cooper et al. (1999), observaram que diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina tornaram-se sensíveis quando expostas a mel de Manuka. Jenkins et al. (2013), a partir de seus estudos, verificaram que a expressão de genes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) diminuíram a virulência em função da exposição a diferentes concentrações ao mel de Manuka e que, embora se tenha o efeito antimicrobiano, ainda não foi encontrado o modo de inibição do *quorum sensing* destas células bacterianas, indicando que há necessidade de maiores estudos.

Basualdo et al. (2007) verificaram a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, mesmo com o mel sendo diluído em 50% (v/v). Gonçalves et al. (2005), analisando o mel de *Nannotrigona testaceicornis* e Serra et al. (2007) analisando amostras de mel de *Apis mellifera* e *Melipona compressipes*, concluíram que todas apresentavam poder de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Cortopassi-Laurindo e Gelli (1991), em seu estudo, concluíram que o potencial antimicrobiano está relacionado com a espécie que produz o mel, e observaram que a bactéria *Bacillus stearothermophilus* se mostrou mais sensível que a *Escherichia coli* quando testados os méis das espécies *Trigonini*, *Meliponini* e *Apis* respectivamente. (GONÇALVES et al., 2005; SERRA et al., 2007; CORTOPASSI-LAURINDO e GELLI, 1991).

Torres et al. (2004) comprovaram a ação do mel de *Tetragonisca angustula*, proveniente da Colômbia, frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*), enquanto os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma viride* não foram sensíveis ao tratamento com mel da referida espécie. Garedeu et al. (2004), investigando o mel de *Trigona* spp, proveniente da Etiópia, comprovaram que as amostras de mel conseguiram inibir o crescimento de cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Irish et al. (2008) comprovaram o efeito do mel da *Trigona carbonaria* contra o *S. aureus*, e Guerrini et al. (2009) também confirmam o potencial bacteriano do mel de abelhas nativas do Equador frente ao *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, a atividade contra *Candida* mostrou-se limitada.

Pimentel et al. (2013), analisando amostras de mel de *Melipona compressipes manaoensis* provenientes de Manaus, confirmaram a atividade bactericida contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* e *Klebsiella* sp. Esses autores utilizando o mel coletado durante o período chuvoso, realizaram o ensaio de disco-difusão, e confirmaram a inibição do crescimento de *Escherichia coli* apenas quando o mel foi testado na forma não diluída. Contudo, quando o mel foi coletado no período seco, este foi eficaz em inibir o crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e diversos outros microorganismos, mesmo em concentrações mais diluídas, comprovando a influência da sazonalidade na atividade bacteriana do mel.

Nishio et al. (2016) avaliaram a ação antimicrobiana do mel de *Melipona compressipes manaosensis* na estação da seca e obtiveram resultados superiores contra à microrganismos Gram positivos quando comparados aos microrganismos Gram negativos.

Alves et al. (2008), comprovou o efeito do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas na pele de ratos, através da melhoria na resposta imunológica, da redução na infecção por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e por consequência uma redução no tempo de cicatrização.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Caracterização dos parâmetros físico-químicos e a atividade antimicrobiana de diferentes méis de abelha sem ferrão contra dois isolados bacterianos (*Salmonella Heidelberg*, *Salmonella Enteritidis*) e três cepas de referência bacterianas (*Salmonella typhimurim* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

1.3.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade antimicrobiana dos diferentes tipos de méis de abelhas sem ferrão;
- Avaliar a sensibilidade das cepas bacterianas contra aos diferentes méis empregados no estudo;
- Determinar a concentração mínima inibitória dos méis de abelha sem ferrão frente as cepas bacterianas, a partir do método de microdiluição;
- Caracterizar os parâmetros físicos-químicos dos diferentes méis de abelha sem ferrão.

2. CAPÍTULO II

MANUSCRITOS

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de manuscritos, com sua formatação de acordo com a orientação da revista aos quais foram submetidos.

Manuscrito I - **Antimicrobial activity and physicochemical properties of honeys from stingless bee**

Submetido à revista Acta Amazônica

Manuscrito II - **Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana do mel de *Melipona bicolor***

Submetido ao Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos

Manuscrito III - **Caracterização físico-química de diferentes méis de abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina**

Submetido ao Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos

2.1 MANUSCRITO I

Antimicrobial activity and physicochemical properties of honeys from stingless bees

Authors: Thaisa Francielle Topolski Pavan BATISTON¹, Denise Nunes ARAÚJO^{2*}

¹ Graduate Program in Animal Science and Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Rua Beloni Trombeta Zanin, 680E, CEP: 89815-630. Chapecó, SC, Brasil.

² Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Rua Beloni Trombeta Zanin, 680E, CEP: 89815-630. Chapecó, SC, Brasil.

* Corresponding author: dnaraujo@hotmail.com

ABSTRACT

In the last years, the bacterial profile resistance have been aggravate by indiscriminate use of antimicrobials in animal production and human health. By the way, new alternatives of therapies are necessary were antimicrobials cannot act due to lack of susceptibility from microorganisms. Natural products as honey are employed in popular medicine with different purposes, due to his therapeutic properties like antimicrobial capacity. However, there are many particularities that remains unknown because of diversity of stingless honey bees. The aim of this study was to evaluate physicochemical parameters and antimicrobial activity of the effect of honey from two stingless bees, against references bacterial strains and bacterial isolates. Physicochemical parameters evaluated was pH, moisture, water activity, acidity, ash, electrical conductivity and color. Antimicrobial activity was determined by agar diffusion assay and minimal inhibitory concentration. Samples of honeys were used at different dilutions, 100%, 75%, 50%, 37.5% and 25%. Results from physicochemical analysis showed a significative difference between two types of honey. Ashes content and the moisture content found are above the limits standardized by Brazilian legislation. The agar diffusion assay demonstrated that honeys has superior antibacterial activity against reference strains compared with bacterial isolates. Minimal inhibitory concentration of 25% from honey was capable to inhibit the growing of reference bacterial strains and bacterial isolates. All the honeys presented antimicrobial activity for the applied tests. Therefore, we conclude that honeys studied from different species of stingless bees are able to sensitize different bacterial strains.

Keywords: natural products, susceptibility, meliponini, characterization

RESUMO

Nos últimos anos, o perfil de resistência bacteriana vem sendo agravado pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal e saúde humana. Frente a esse paradigma, houve a necessidade de buscar novas alternativas de terapias onde os antimicrobianos não conseguem atuar pela falta de susceptibilidade de diversos microrganismos. Os produtos naturais como o mel têm sido utilizados pela medicina popular para diferentes propósitos, devido a suas propriedades terapêuticas, dentre elas a antimicrobiana. Entretanto, diante da variedade de espécies de abelhas produtoras de mel, existem particularidades que permanecem desconhecidas. O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros físico-químicos e a atividade antimicrobiana do efeito do mel de duas abelhas sem ferrão, contra cepas bacterianas de referência e isolados bacterianos. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH, umidade, atividade da água, acidez, cinzas, condutividade elétrica e cor. A atividade antimicrobiana foi determinada através dos ensaios de difusão em ágar e concentração mínima inibitória. Foram utilizadas amostras de méis em diferentes diluições, 100%, 75%, 50%, 37,5% e 25%. Os resultados da análise físico-química mostraram uma diferença significativa entre dois tipos de mel. O conteúdo de cinzas e o teor de umidade encontrado estão acima dos limites padronizados pela legislação brasileira. O ensaio de difusão em ágar demonstrou que os méis têm atividade antibacteriana superior contra cepas bacterianas de referência em comparação com isolados bacterianos. A concentração inibitória mínima de 25% de mel foi capaz de inibir o crescimento de cepas bacterianas de referência e isolados bacterianos. Todos os méis apresentaram atividade antimicrobiana para os testes aplicados. Portanto, concluímos que méis estudados de diferentes espécies de abelhas sem ferrão são capazes de sensibilizar diferentes cepas bacterianas.

Palavras-chave: produtos naturais, susceptibilidade, meliponini, caracterização

INTRODUCTION

The stingless bees are social insects, belonging to the order Hymenoptera and the family Apidae (Meliponini), these species are closely linked to the tropical and subtropical regions (Michener et al., 2013; Chuttong et al., 2016).

Honey is a natural product recognized in the traditional world medicine for having medicinal properties such as antimicrobial properties (Alvarez-Suarez et al., 2010, Kwarman et al., 2012; Laallam et al., 2015; Mcloone et al., 2016, Silva et al., 2017).

Its antimicrobial potential and physicochemical profile of honey are related to the geographic location, climatic conditions, and variation of the nutritional source of the beehive during the seasons (Sherlock et al., 2010; Kwakman et al., 2011; Hussain et al., 2015; Laallam et al., 2015; Nshio et al., 2016; Ekhtelat, et al., 2016; Wasfi et al., 2016). In addition, the processing, handling and storage of honey may influence its composition (Sherlock et al., 2010; Alvarez-Suarez et al., 2010; Nishio et al., 2016).

Honey from stingless bees is stored in pots that are made of wax and propolis; part of the phytochemical constituents of propolis may be diffused into the honey during the period in which it would be stored conferring antimicrobial properties (Temaru et al., 2007; Ballivián, 2008; Suntiparapop et al.; 2012).

In Brazil it is very common to use phytotherapies and homemade syrups with the use of honey in popular therapies, mainly by indigenous and rural areas, due to the belief that this type of honey has healing properties (POSEY, 1987; Cortopassi-Laurino and Gelli, 1991; Madaleno, 2015).

Nowadays, due to widespread concern about the increasing emergence of resistant pathogens, alternative antimicrobials strategies are needed using natural and non conventional sources, mainly, Honey has been highlighted as an alternative to sensitize microorganisms that are

resistant to antibiotics and, mainly, because it is a natural product (Boorn et al. 2010; Pimentel et al., 2013; Campeau and Patel, 2014; Laallam et a., 2015).

However, data on the antimicrobial activity of Brazilian honey are still limited (Nishio et al., 2014; Bueno-Costa et al., 2016). In this way, the study aimed to evaluate the physicochemical parameters and the antimicrobial activity of *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* honeys against reference strains and bacterial isolates.

MATERIALS AND METHODS

Honey samples

The honey samples were kindly provided by a private meliponary (Chapecó-SC, Brazil) in the summer season of 2017. The samples of honey used were obtained from the stingless bees *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) and *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1836). The samples were stored under refrigeration (0 °C at 4 °C) and protected from light in sterile bottles with hermetic closure.

Physicochemical analyses

The moisture content of the samples was determined by the refractometer (Atago Co, 1988), with values expressed in ° Brix, from which the moisture value (%) was calculated (Alves et al., 2005). The water activity (Aw) was determined using the Aqualab (Decagon, 2003) (Kuroish et al., 2012). To determine the ashes content, 5 grams of honey was weighed in a previously calcined crucible, and the oven was subjected to 550 ° C for three hours (IAL, 2008). The pH, acidity and electrical conductivity of the samples were analyzed according to the recommendation Bogdanov et al. (1997). Color determination was performed with the aid of a spectrophotometer (Metrolab 1700 uvvis, JP) by the measurement of absorbance in the visible region at 635 nm in diluted solution of honey and distilled water (50:50) (m / v) being used the glycerin as white. The reference values found were compared to those of the Pfund scale according to the methodology described by Bianchi (1981).

Bacterial Strains

The antibacterial properties of two honeys were tested against two bacterial isolates: *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Enteritidis, and three reference strains: *Salmonella typhimurim* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The bacterial isolates were identified by a private laboratory accredited for *Salmonella* isolation. These isolates were provided from a slaughterhouse in Paraná State, Southern Brazil in 2013. All strains were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in stocks containing glycerol.

Agar well diffusion assay

The assay well diffusion was carried out based on the work of Perez et al. (1990) with Muller Hinton agar plates (Kasvi, CHN). The plates were inoculated by rubbing sterile cotton swabs that were dipped into bacterial suspensions incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24h in Brain Heart Infusion Broth (Himedia, IND) over the entire surface of the plate. Each bacterial strain was suspended in sterile saline and adjusted to 0.5 on the McFarland scale, which corresponds to 1.5×10^8 CFU ml^{-1} . After inoculation, 6 mm diameter wells were cut into the surface of the agar using a sterile device. The honey dilutions were prepared fresh daily prior each to testing, prepared aseptically for use the agar well diffusion assay from 100%, 75%, 50%, 37,5%, 25% and 0% v/v in sterile water (negative control). These wells were filled with 100 μl of the concentrations stated. Plates were incubated at 37°C for 24 h. The diameter of zones, including the diameter of the well, was recorded with the aid of a millimeter scale. Each assay was carried out with six replicates per dilution honey.

Minimum inhibitory concentration

Susceptibility to different stingless bee honeys was determined using the microdilution method with sterile 96-well plate according to CLSI standards (2012). The bacterial suspensions were prepared as described in well diffusion assay. These suspensions were

diluted in Muller Hinton broth (Kasvi, CHN) and adjusted to 0.5 on the McFarland scale. The honeys dilutions were prepared fresh daily prior each to testing, prepared aseptically for use. The control wells contained only broths were considered sterility control and wells with bacteria and broth as positive control. For that, each honey sample was used to prepare solutions of different proportion (v/v): 0, 25, 37,5, 50, 75 and 100%. Ten μl of 0.5 McFarland standardised culture was added to 190 μl of honey dilutions, in each well (three replicates per dilution, five dilutions tested). After the plates were incubated at 37 ° C for 24 h, 20 μl of 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride per well was added. The appearance of red color after 3 hours of incubation was considered as indicative of microbial growth. The minimum inhibitory concentration was defined as the lowest concentration of honey that showed no visible growth after incubation.

Statistical Analyses

Physicochemical data were analyzed by One way Anova to determine the significant differences among means. Differences were considered significant using Tukey if $P \leq 0,05$. The zones of inhibition obtained from the susceptibility by agar diffusion assay carried out were expressed mean \pm standart deviation. All analyses were done using Origin 8 (OriginLab Northampton, MA, USA).

RESULTS

Physicochemical parameters of honey

The physicochemical parameters of the honeys produced by the *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca angustula* are presented in Table 1. The data from physicochemical analysis showed a significative difference between two types of honey to pH, moisture, ash content, color and water activity. However do not showed a difference about as total acidity and electrical conductivity. The ash content and the moisture are above the limits required by Brazilian legislation, and for acidity the parameter is in conformity. (Brasil, 2000).

Antimicrobial activity

The agar diffusion assay demonstrated that honeys has superior antibacterial activity against reference strains compared with bacterial isolates (Table 2). For both types of honeys we can see that they produce an interesting antibacterial effect for all the concentrations used. In addition, at lower concentrations, even with lower zones of inhibition, honeys continued to have an antibacterial effect for bacterial isolates and reference strains.

For the MIC data we observed a more sensitive measure of antimicrobial activity than the agar diffusion test. The assay showed that growth of all five bacteria was largely inhibited to 25% dilution for both stingless bee honeys.

DISCUSSION

Physicochemical parameters of honey

Tetragonisca angustula honey has the lowest moisture content (26.98%), however, it is in disagreement with the current Brazilian legislation that until now considers only the physico-chemical aspects of honey produced by *Apis mellifera* (Brasil, 2000). In the work carried out by Anacleto et al. (2009) the moisture content for *Tetragonisca angustula* presented above the current legislation with percentages ranging from 23.00 to 32.50%. *Melipona quadrifasciata* honey presented the highest moisture content found, corroborating with the study of Alves et al. (2005), who verified that this species, even in dry climate, produces honey with high humidity. The oxidation process is related to the moisture content, if this content is low in mature honey, the action of glucose oxidase will be impaired, thus reducing the levels of hydrogen peroxide, which is known as one of the factors responsible for the antimicrobial action of honey (Laallam et al., 2015).

Water activity below 0.6 ensures low microbial proliferation. Lage et al. (2012) found water activity ranging from 0.59 to 0.79 in species of stingless bees, values similar to those determined in this study. Bogdanov (2008) states that the antimicrobial activity of honey

correlates significantly with acidity, recognizing that the acidic fraction positively influences biological activity, since pH acts as an antimicrobial factor. Nascimento et al. (2015), obtained pH values between 2.93 and 4.08, values very close to those presented in this study. Campos et al. (2010) comments that pH is a parameter that assists in the evaluation of total acidity and its variation may be related to the nutritional composition of the stingless bees diet, depending on the pH of the nectar and mandibular substances.

From the electrical conductivity data presented, we can classify the honeys of the stingless bee studied as being from floral sources. This parameter is closely related to the concentration of minerals, organic acids and proteins, demonstrating a great variability of the floral source of honey (Suntiparapop et al., 2012; Nascimento et al., 2015).

The color of stingless bees honey may be related to the higher mineral content. According to the constitution of honey, we can find a variety of different spectra and colors. This property, however, may be related to the pollen and the phenolic compounds present in the honey, which varies, in turn, in relation to the geographical origin and botanical varieties visited by the bees (Moo-Huchin et al., 2015).

Antimicrobial activity

The results showed that the *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* honeys are effective against the bacteria under study. All the bacteria showed sensibility to any of the honey samples. Basualdo et al., (2007) showed in their study that the antimicrobial effect of honey is dependent on the concentration of the honey used and the nature of the bacteria. The agar diffusion assay showed that the most sensitive bacteria are the reference strains, where there was no difference in the sensitivity of Gram negative or positive strains. The agar diffusion assay technique was used for measurement of the antibacterial activity of honey in the majority of the in vitro studies (Sherlock et al., 2010; Kwakman et al., 2011; Laallam et al., 2015; Nishio et al., 2016). In the present study, a different concentrations of honey was

used to easily determine the zone of inhibition and minimum inhibitory concentration of honey that inhibited the growth of bacteria. In addition, other studies like this have used distilled water to obtain various volume/volume concentrations of honey (Boorn et al., 2010; AL-Waili et al., 2013; Nishio et al., 2016). In this study, it was observed the data obtained from the agar diffusion assay showed large standard deviations. Different factors may be associated with this situation, the method used to inoculate the bacteria on the surface of the agar as well as the diffusivity of the honey and the dilutions in the well in the agar (Kwakman et al., 2011; Nishio et al., 2016). However, there is a lack of standardization of antibacterial activity and incomplete knowledge of which are the active components that have antimicrobial effect for the application of honey in current medicina (Kwakman et al., 2011). The lowest dilution of honey found in this study for the minimum inhibitory concentration was 25% (v/v), for all bacteria strains. However, this result is superior than those published by Sherlock et al. (2010), for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* the lowest dilution found was 3,1% for Ulmo honey produced by *Apis mellifera*. In the study of Garedew et al. (2003) and Boorn et al. (2010) with *Trigona* spp. showed different minimum inhibitory concentration values for bacteria Gram-negative (4 to 32%) and Gram-positive (1 to 32%). Nishio et al. (2016), were found different values ranging from 0.63 to 10% among Gram-positive bacteria and from 2.5 to 10% among Gram-negative bacteria. These authors demonstrated that gram-positive bacteria are more sensitive than gram-negative bacteria in the presence of different stingless bee honey, including honeys of *Apis mellifera*, where *Staphylococcus aureus* seems to be the most sensitive microorganism to antimicrobial activity of honey. In ours study this effect is not showed for the minimum dilution employed.

CONCLUSIONS

Melipona quadrifasciata and *Tetragonisca angustula* honeys presents some differences about the physicochemical characteristics, this is which may be related to the intrinsic behavior of

each species. However, information is absent to relate these parameters to antimicrobial activity. This study asserts that reference strains are more sensitive than bacterial isolates in relation to agar diffusion assay. For the minimal inhibitory concentration it was observed that the lower dilution employed was able to inhibit bacterial growth. Results of agar diffusion assay suggests that this method would not be the most appropriate to evaluate the sensitivity of bacteria when exposed to *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* honeys. However, we suggest that the honeys studied from the two species of stingless bees are efficient to sensitize different bacterial strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the State University of Santa Catarina for the support in the realization of this research and the stingless beekeeping who provide the samples of honeys. Also to thank CAPES for providing the scholarship during the masters period.

REFERENCES

- ALVES, R. M.O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C. 2005. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona manduca* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25: 644-650.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. TULIPANI, S. DIA, D. ESTEVEZ, Y. ROMANDINI, S. GIAMPIERI, F. DAMIANI, E. ASTOLFI, P. BOMPADRE, S. BATTINO, M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2490-2499.
- AL-WAILI, N.; A. GHAMDI, AL.; ANSARI, M. J.; AL-ATTAL, Y.; AL-MUBARAK, Y.; SALOM, K. 2013. *Archives of Medical Research*, 44: 307-316.
- BALLIVIÁN, J.M.P.P. *Abelhas nativas sem ferrão*. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128p.
- BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M.S.; MARIOLI, J.M. 2007. Comparison of the

antibacterial activity of honey from different prevalence against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*. 124; 375-381.

BIANCHI, E. M. *La miel, características y composición – Análisis y Adulteraciones*. Santiago del Estero, Argentina: UNSE – CEDIA, 1981.

BOGDANOV, S.; JURENDIC, T.; SIEBER, R.; GALLMAN, P. 2008. Honey for nutrition and health: a review. *American Journal of the College of Nutrition*. 27: 677-689.

BOORN, K. L.; KHOR, Y. -Y.; SWEETMAN, E.; TAN, F.; HEARD, T.A.; HAMMER, K.A. 2010. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 108: 1534–1543.

BUENO-COSTA, F. M.; ZAMBIAZI, R. C.; BOHMER, B.; CHAVES, F. C.; SILVA, W. P. da; ZANUSSO, J. T.; DUTRA, I. 2016. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Science and Technology*. 65: 333-340.

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

CAMPEAU, M. E. M.; PATEL, R. 2014. Antibiofilm Activity of Manuka Honey in Combination with Antibiotics. *International Journal of Bacteriology*. 7.

CAMPOS, F. S., GOIS, G. C., CARNEIRO, G. G. 2010. Physico-chemical parameters of the honey of stingless bee *Melipona scutellaris* produced in the Paraíba. *Zootecnia*, 7: 186-190.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. 2016. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). *Food Chemistry*. 192:149–155.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 9 ed. Wayne, PA, USA, 2012.

CORTOPASSI-LAURINO, M., 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.

EKHTELAT, M.; RAVAJI, K.; PARVARI, M. 2016. Effect of Iranian Ziziphus honey on growth of some foodborne pathogens. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 7: 54-57.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. 2003. The antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp.. *Journal of Apicultural Science*. 47.

HUSSAIN, M. B.; HANNAN, A.; AKHTAR, N.; FAYYAZ, G. Q.; IMRAN, M.; SALEEM, S.; QURESHI, I. A. 2015. Evaluation of the antibacterial activity of selected Pakistani honeys against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:32.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: IMESP, 2008.

KWAKMAN, P.H.S.; TE VELDE, A.A.; DE BOER, L.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; ZAAT, S.A.J. 2011. Two Major Medicinal Honeys Have Different Mechanisms of Bactericidal Activity. *PLoS ONE*. 6:3.

KWAKMAN, P.H.S.; ZAAT, S. A. J. Critical Review: Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life*, 64:48–55.

LAGE, L. G.A., COELHO, L. L.; RESENDE, H. C.; TAVARES, M. G.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. 2012 Honey physicochemical properties of three species of the brazilian Melipona. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84: 605-608.

LAALLAM, H.; BOUGHEDIRI, L.; BISSATI, S.; MENASRIA, T.; MOUZAOU, M.S.; HADJADJ, S.; HAMMOUDI, R.; CHENCHOUNI, H. 2015. Modeling the synergistic antibacterial effects of honey characteristics of different botanical origins from the Sahara

Desert of Algeria. *Frontiers in Microbiology*. 6:1239.

MADALENO, Isabel. 2015. Plantas medicinais consumidas em Cochim, no século XVI e na atualidade. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas*. 10: 109-142.

MCLOONE, P.; Warnock, M.; Fyfe, L. 2016. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 49, 161-167.

MICHENER, C. D. 2013. The Meliponini. In P. Vit et al. (Eds.), *Pot-honey a legacy of stingless bees*. New York: Springer. 3–17p.

Moo-HUCHIN, V. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; LIRA-MAAS, J. D.; PÉREZ-PACHECO, E.; ESTRADA-LEÓN, R.; Moo-HUCHIN, M. I.; SAURI-DUCH, E. 2015. Physicochemical Properties of *Melipona beecheii* Honey of the Yucatan Peninsula. *Journal of Food Research*. v.4, n.5.

NISHIO, E. K.; KRUPINISKI, M. T.; KOBAYASHI, R. K. T.; PRONI, E. A.; NAKAZATO, G. 2014. Avaliação da Atividade Antibacteriana de Dois Méis de Abelhas Indígenas Sem Ferrão Contra Bactérias de Importância Alimentar. In: *Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos – MICROAL*. n.1, v.1. São Paulo.

NISHIO, E. K.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; PRONI, E. A.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. 2016. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Scientific Reports*. 6:21641.

PEREZ, C., M. PAULI, P. BAZERQUE, 1990. An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *Acta Biologicae et Medicinal Experimentalis*. 15, 113-115.

PIMENTEL, R. B. DE Q.; COSTA, C. A. DA; ALBUQUERQUE, P. M.; DUVOISIN JUNIOR, S. 2013. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 151.

POSEY, D. A. 1987. Etnoentomologia de tribos indígenas da amazonia. In: RIBEIRO, D. Suma etnológica brasileira: Etnobiologia, 2.ed. Petrópolis: FINEP. 251-271p.

SILVA, L.C.N. da; SILVA, M.V. da; CORREIA, M.T.dos S. 2017 Editorial: New Frontiers in the Search of Antimicrobials Agents from Natural Products. *Fronties Microbiology*. 8:210.

SHERLOCK, O.; DOLAN, A.; ATHMAN, R.; POWER, A.; GETHIN, G.; COWMAN, S.; HUMPHREYS, H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10:47.

SUNTIPARAPOP, K.; PRAPAIPONG, P.; CHANTAWANNAKUL, P. 2012. Chemical and biological properties of honey from Thai stingless bee (*Tetragonula leaviceps*), *Journal of Apicultural Research*, 51:1, 45-52.

WASFI, R.; ELKHATIB, W.F.; KHAIRALLA, A.S. 2016. Effects of Selected Egyptian Honeys on the Cellular Ultrastructure and the Gene Expression Profile of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 0150984.

Table 1. Differences in the physicochemical parameters of two types of honey

Specie	pH	Moisture (%)	Water Activity (Aw)	Total acidity (mEq.Kg ⁻¹)	Ashes Content (%)	Eletrical Conductivity (μ S.cm ⁻¹)	Pfund Scale (mm)	Name Color
<i>Melipona quadrifasciata</i>	3,37(\pm 0,21)a	31,23(\pm 0,63)a	0,74(\pm 0,02)a	44,63(\pm 21,95)a	1,42(\pm 1,21)a	194,01(\pm 96,90)a	57,4900a	Âmbar Claro
<i>Tetragonisca angustula</i>	3,89(\pm 0,28)b	26,98(\pm 1,66)b	0,67(\pm 0,05)b	45,56(16,74)a	4,88(\pm 1,60)b	228,34(\pm 67,95)a	92,2562b	Âmbar

Values of each parameter are given in means \pm SD. The same letters in the columns indicating no differences between the means according to Turkey at < 0.05 , which followed One-way ANOVA.

Table 2. Mean Zones of Inhibition (diameter mm including well (6 mm)) of two types of honey (% v/v) against each bacterial strain

	Concentration of honey	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Heidelberg
<i>Melipona</i> <i>quadrifasciata</i>	100%	28,7 (±9,1)	31 (±6,0)	39 (±7,6)	26 (±1,3)	26,7 (±6,0)
	75%	27 (±7,4)	29,4 (±13,5)	28 (±13,9)	25 (±2,8)	26,7 (±6,9)
	50%	27 (±7,4)	26,8 (±4,7)	30 (±0)	23,3 (±2,1)	22,7 (±4,1)
	37,5%	23,5 (±6,4)	17,3 (±10,3)	27,2 (±4,0)	21,5 (±3,1)	13,3 (±11,7)
	25%	20,8 (±10,2)	14,4 (±11,9)	20,2 (±9,8)	16,3 (±3,3)	9,2 (±10,7)
<i>Tetragonisca</i> <i>angustula</i>	100%	30 (±0,0)	27,2 (±2,3)	33,8 (±3,8)	25,6 (±1,6)	25,7 (±1,0)
	75%	29,8 (±3,3)	26,9 (±1,4)	28,3 (±14)	25,8 (±3,7)	23,2 (±1,6)
	50%	27,8 (±4,2)	25,6 (±3,0)	28,2 (±5,3)	22,8 (±2,8)	21,7 (±2,6)
	37,5%	25 (±3,5)	16,7 (±13,2)	25,3 (±5,3)	21,8 (±3,4)	14,5 (±11,4)
	25%	24 (±2,2)	10,3 (±11,5)	15,5 (±8,2)	17,2 (±9,3)	9,2 (±10,2)

Table 3. Minimum inhibitory concentrations of two types of honey (% v/v) against each bacterial strain

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Heidelberg
<i>Melipona quadrifasciata</i>	>25%	>25%	>25%	>25%	>25%
<i>Tetragonisca angustula</i>	>25%	>25%	>25%	>25%	>25%

> is related to the lower inhibitory concentration found in the assay.

MANUSCRITO II**Caracterização físico-química de diferentes méis de abelhas sem ferrão
do estado de Santa Catarina**Thaís Francielle Topolski Pavan Batiston¹Denise Nunes Araújo²

¹ Mestranda em Zootecnia. Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Zootecnia, campus Chapecó. E-mail: thaisapavan@yahoo.com.br

² Doutora em Zootecnia. Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Zootecnia, campus Chapecó. E-mail: dnaraújo@hotmail.com

RESUMO

As abelhas sem ferrão são insetos sociais que produzem mel, geograficamente são encontradas em regiões tropicais e subtropicais. As características dos méis de abelhas sem ferrão estão relacionadas com diferentes fatores como a espécie de abelha que o produz, a fonte nutricional, as condições geográficas e climáticas, bem como do manejo do meliponicultor. E devido à falta de conhecimento sobre o produto - mel de abelhas sem ferrão, este não encontra-se incluído nos padrões nacionais e internacionais de qualidade do mel. Portanto, objetivou-se com este trabalho caracterizar os parâmetros físico-químicos de diferentes espécies de abelhas sem ferrão provenientes do estado de Santa Catarina. Foram avaliados os méis de 7 espécies de abelha sem ferrão de diferentes meliponários, sendo investigados os parâmetros de pH, umidade, atividade da água, acidez, cinzas, condutividade elétrica e cor. Os resultados físico-químicos foram comparados com os requisitos estabelecidos pela legislação brasileira e demonstraram que para os teores de umidade, cinza e acidez a maioria dos valores médios encontram-se fora dos limites estabelecidos pela legislação vigente. A atividade de água variou entre 0,67 – 0,78 entre as espécies e o pH entre 3,37 – 3,93. Os dados obtidos para condutividade elétrica permitiram classificar os méis como de origem floral, e a cor dos méis variaram entre âmbar extra-claro para âmbar escuro. Podemos concluir com este estudo que os resultados encontrados para os parâmetros físico-químicos destoam da atual legislação brasileira. Sendo necessário compreender a importância destes parâmetros para buscar um padrão adequado às espécies de abelhas sem ferrão evitando futuras adulterações na constituição do mel a ser comercializado.

PALAVRAS-CHAVE: MELIPONICULTURA, QUALIDADE, PADRONIZAÇÃO, MANEJO DE COLMÉIAS

INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão são insetos sociais, pertencem a ordem Hymenoptera e a família Apidae (Meliponini), estas espécies estão intimamente ligadas às regiões tropicais e subtropicais, apresentando assim uma distribuição geográfica mundial limitada em comparação à *Apis mellifera* (CRANE, 1990; MICHENER et al., 2013; CHUTTONG et al., 2016).

Há uma grande diversidade de abelhas sem ferrão, existem cerca de 500 espécies sendo elas presentes na América do Sul e algumas na Austrália, Ásia e África (MICHENER et al., 2013; MOO-HUCHIN et al., 2015).

A composição físico-química do mel está relacionada com a localização geográfica, com as condições climáticas, e com a variação da fonte nutricional da colméia durante as estações do ano (MAVRIC et al., 2008; KWAKMAN et al., 2011; HUSSAIN et al., 2015; LAALLAM et al., 2015; NISHIO et al., 2016; EKHTELAT, et al., 2016; WASFI et al., 2016). Outros fatores como o processamento, manuseio e armazenamento do mel podem influenciar na sua composição (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; NISHIO et al., 2016).

Uma característica intrínseca das espécies de abelhas sem ferrão é a capacidade destas em armazenar o mel em pequenas estruturas que variam de volume de acordo com a espécie. Estas estruturas de armazenamento são comumente chamadas de potes de cerume, que são formadas a partir de cera e própolis. Acredita-se que parte dos constituintes fitoquímicos da própolis acabam por ser difundidos no mel durante o período em que este ficaria armazenado conferindo-lhe uma constituição variada em sua composição físico-química (TEMARU et al., 2007; BALLIVIÁN, 2008; SUNTIPARAPOP et al.; 2012).

A Instrução Normativa nº 11 (BRASIL, 2000) bem como o Codex alimentarius (2001) não especificam os parâmetros físico-químicos para o mel produzido pelas espécies de abelhas

sem ferrão. Há pouca informação sobre as características físico-químicas destes méis produzidos pelas abelhas sem ferrão.

Na meliponicultura brasileira não há um censo oficial sobre o número de colônias mantidas em caixas e estimativas da produção de mel de abelhas sem ferrão (SOUZA, 2008; JAFFÉ et al., 2015). O sistema de produção não tem gestão padronizada e o conhecimento técnico é escasso, sendo caracterizada como uma atividade essencialmente informal, com diversas motivações, incluindo conservação de espécies nativas, interesse para produção de mel e como animais de estimação (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; SOUZA, 2008; JAFFÉ et al., 2015; MOO-HUCHIN et al., 2015).

Portanto, objetivou-se com este trabalho caracterizar os parâmetros físico-químicas de diferentes espécies de abelhas sem ferrão provenientes do estado de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de mel de abelhas sem ferrão utilizadas neste estudo foram cedidas gentilmente por meliponicultores de diferentes cidades do estado de Santa Catarina no período compreendido entre dezembro de 2016 e fevereiro de 2017, totalizando 20 amostras de méis de 7 espécies (Tabela 1). Estas amostras foram coletadas diretamente das colmeias com o auxílio de bomba à vácuo acoplada diretamente à frascos de tubo falcon. Após a coleta as amostras permaneceram armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz. As análises físico químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), localizado na Universidade do Estado de Santa Catarina campus Chapecó.

Análises físico-químicas

A umidade das amostras foi determinada através de refratômetro (Atago Co, 1988), com os valores expressos em °Brix, a partir do qual foi calculado o valor da umidade (%). A atividade de água (A_w) foi determinada utilizando o aparelho AquaLab (Série 3 modelo TE, 2003), que

utiliza a técnica de determinação do ponto de orvalho em espelho encapsulado. Para determinação do teor de, cinzas pesou-se 5 gramas de mel em cadinho previamente calcinado, submeteu-se forno mufla a 550 °C por três horas (IAL, 2008). O pH, a acidez e a condutividade elétrica das amostras foram analisadas de acordo com a recomendação Bogdanov et al. (1997). A determinação da cor foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro (Metrolab 1700 uvvis, JP) através da medida de absorbância na região do visível a 635 nm, em solução diluída de mel e água destilada (50:50) (m/v). Como padrão branco, foi utilizada a glicerina. Os valores de referência encontrados foram comparados aos da tabela de Pfund, conforme metodologia descrita por Bianchi (1981).

Tabela 1. Amostras de mel de meliponíneos, destacando a espécie e o município de procedência do estado de Santa Catarina (Brasil).

Espécie de abelha sem ferrão	Nome popular	Procedência (número da amostra)
<i>Melipona rufiventris mondory</i> LEPELETIER, 1836	Bugia	Urubici (14)
<i>Melipona bicolor</i> LEPELETIER, 1836	Guaraipo	Chapecó (6, 7), Maravilha (16), Urubici (13)
<i>Tetragonisca angustula</i> LATREILLE, 1811	Jataí	Chapecó (9, 19), Xanxerê (1, 3), Maravilha (15), Seara (20),
<i>Melipona quadrifasciata</i> LEPELETIER, 1836	Mandaçaia	Chapecó (8, 10, 18), Xanxerê (2), Vidal ramos (17), Urubici (11)
<i>Melipona marginata</i> LEPELETIER, 1836	Manduri	Chapecó (5)
<i>Scaptotrigona bipunctata</i> LEPELETIER, 1836	Tubuna	Vidal ramos (12)
<i>Tetragona clavipes</i> FABRICIUS, 1804	Borá	Chapecó (4)

Análise estatística

As médias das triplicatas dos dados das análises físico-químicas foram submetidas ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnof, indicando uma distribuição normal. As variáveis estudadas foram agrupadas por espécie e comparadas pela análise de variância; caso houvesse diferença significativa ($P < 0,05$), utilizou-se o teste de Tukey a 5% de significância. Os dados

para a análise estatística foram tratados através do Software OriginPro 8 (OriginLab Northampton, MA, USA).

RESULTADOS

O pH das amostras de méis variou entre 3,37 – 3,93, não havendo diferença significativa entre as espécies *Tetragonisca angustula* e *Tetragona Clavipes* (Tabela 2). Houve diferença ($P < 0,05$) destas espécies em relação *Meliponas* e *Scaptotrigona bipunctata*, salvo a *Melipona marginata*, que não diferiu dentre as demais espécies. O teor de umidade para todas as amostras apresentou-se superior a 20%. Somente o mel de *Tetragonisca angustula* diferiu das demais espécies, apresentando o menor teor de umidade (26,98%). Em relação a atividade de água, está se mostrou superior para a espécie *Tetragonisca angustula* em relação as demais, com exceção da *Melipona mondury*. Para algumas amostras de méis, os valores de acidez variaram entre 21,18 a 112,87 mEq.Kg⁻¹. Ainda em relação a esta variável, o mel de *Tetragona clavipes* não diferiu do mel da *Scaptotrigona bipunctata* que, por sua vez, não diferiu do mel de *Melipona bicolor* apresentando valores similares as demais espécies. Os teores de cinzas variaram entre 0,38 a 4,88%; o mel da *Tetragonisca angustula* diferiu do mel de *Melipona mondury*, *Melipona bicolor*, *Melipona quadrifasciata* e *Tetragona clavipes*. Somente o mel da espécie *Tetragona clavipes* diferiu em relação as demais quanto aos valores de condutividade elétrica (557 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e cor (255,07 mm Pfund/Âmbar escuro)

Tabela 2. Resultados dos parâmetros físico-químicos dos diferentes méis de abelha sem ferrão ($p \leq 0,05$)

c	Ph	Umidade (%)	Aw	Acidez (mEq.Kg ⁻¹)	Cinzas (%)	Condutividade. Elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Cor (Abs635nm)
<i>Melipona mondury</i>	3,69($\pm 0,25$) ^{ab}	29,6($\pm 0,10$) ^a	0,72($\pm 0,02$) ^{ab}	21,18($\pm 1,26$) ^a	0,38($\pm 0,32$) ^a	108,07($\pm 0,25$) ^a	Âmbar Claro ^{ad}
<i>Melipona bicolor</i>	3,38($\pm 0,20$) ^a	30,08($\pm 1,58$) ^a	0,74($\pm 0,04$) ^a	46,58($\pm 17,58$) ^{ab}	1,36($\pm 1,50$) ^a	198,56($\pm 96,85$) ^a	Âmbar Extra-Claro ^a
<i>Melipona marginata</i>	3,61($\pm 0,03$) ^{ab}	30,30($\pm 0,36$) ^a	0,72($\pm 0,0$) ^a	29,96($\pm 2,99$) ^a	3,98($\pm 2,18$) ^{ab}	190,03($\pm 0,06$) ^a	Âmbar Claro ^{ab}
<i>Melipona quadrifasciata</i>	3,37($\pm 0,21$) ^a	31,23($\pm 0,63$) ^a	0,74($\pm 0,02$) ^a	44,63($\pm 21,95$) ^a	1,42($\pm 1,21$) ^a	194,01($\pm 96,90$) ^a	Âmbar Claro ^a
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	3,45($\pm 0,0$) ^{ab}	29,77($\pm 0,06$) ^a	0,78($\pm 0,02$) ^a	91,57($\pm 2,65$) ^{bc}	3,60($\pm 1,49$) ^{ab}	274,33($\pm 0,58$) ^a	Âmbar Escuro ^b
<i>Tetragona clavipes</i>	3,93($\pm 0,02$) ^b	30,37($\pm 0,55$) ^a	0,75($\pm 0,01$) ^a	112,87($\pm 19,17$) ^c	0,90($\pm 0,64$) ^a	557,00($\pm 1,00$) ^b	Âmbar Escuro ^c
<i>Tetragonisca angustula</i>	3,89($\pm 0,28$) ^b	26,98($\pm 1,66$) ^b	0,67($\pm 0,05$) ^b	45,56(16,74) ^a	4,88($\pm 1,60$) ^b	228,34($\pm 67,95$) ^a	Âmbar ^{bd}

Os dados estão apresentados com suas respectivas médias \pm SD. As mesmas letras nas colunas indica que não há diferenças entre médias de acordo com o teste de Tukey $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

O mel de abelhas sem ferrão possui a característica intrínseca de ser mais higroscópico, mesmo em ambientes com menor umidade (NASCIMENTO et al, 2015). O teor de umidade das amostras apresentaram-se acima de 20%, parâmetro considerado ideal pela legislação brasileira (BRASIL, 2000). Entretanto, o mel de *Melipona quadrifasciata* apresentou o maior teor de umidade encontrado, corroborando com o estudo de Alves et al. (2005), que verificou que esta espécie, mesmo em clima seco, produz mel com alta umidade. Bogdavov e Blumer (2001) explicam que, uma vez que a água é essencial para o processo de oxidação, o peróxido de hidrogênio é produzido significativamente mesmo em méis imaturos que possuem um alto teor de água. No caso do teor de umidade ser baixo no mel maduro, o processo de oxidação é limitado em função da glicose oxidase encontrar-se praticamente inativa. Méis com baixo teor de umidade terão uma pequena quantidade de peróxido de hidrogênio, que é conhecido por evitar o crescimento microbiano (LAALLAM et al., 2015).

Peralta (2010) em seu estudo encontrou valores de pH para méis de meliponíneos entre 3,2 e 3,9; Nascimento (2015), obteve valores de pH entre 2,93 à 4,08, valores estes muito próximos dos apresentados neste trabalho. Campos et al. (2010) comenta que o pH é um parâmetro que auxilia na avaliação da acidez total e sua variação pode estar relacionada à composição nutricional da dieta da abelha, dependendo do pH do néctar e das substâncias mandibulares. Lage et al. (2012) não observou relação entre o baixo valor de pH encontrado em relação ao elevado teor de acidez.

O baixo valor de pH e a elevada acidez detectados no mel de Melíponas lhe conferem uma maior vida útil, pois não favorecem o desenvolvimento microbiano. Por outro lado, o alto teor de atividade de água, favoreceria o crescimento de microrganismos (LAGE, et al., 2012). Atividade de água inferior a 0,6 assegura uma baixa proliferação microbiana (HOFFMANN, 2001). Lage et al. (2012) encontraram atividade de água variando entre 0,59 a 0,79 em

espécies melíponas; Almeida-Muradian (2007) encontrou valores variando entre 0,74 a 0,76, valores estes semelhantes aos determinados neste estudo. Bogdanov (1997) afirma que a atividade antimicrobiana do mel correlaciona-se significativamente com a acidez, reconhecendo que a fração ácida influencia positivamente na atividade biológica, pois o pH atua como um fator antimicrobiano. Peralta (2010) encontrou valores distintos de acidez para as abelhas sem ferrão, de 17,8 a 116,7 meq.Kg⁻¹, semelhante aos dados obtidos.

A partir dos dados de condutividade apresentados, podemos classificar os méis das espécies estudadas como sendo de fontes florais. Este parâmetro encontra-se intimamente relacionado à concentração de minerais, ácidos orgânicos e proteínas, demonstrando grande variabilidade da fonte floral do mel (ALVES, 2005; SUNTIPARAPOP et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2015). Nascimento et al. (2015) encontraram valores entre 586,20 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ e 539,60 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ para diferentes espécies de meliponídeos no Brasil. Chuttong et al., (2016), encontraram variação entre 0.325 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ a 2,8 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ para diferentes espécies de abelhas sem ferrão da Tailândia. Bogodanov et. al. (1999) afirmam que a condutividade deve ser utilizada como critério para a determinação botânica do mel, substituindo a análise de teor de cinzas, pois essa medição seria proporcional ao teor de cinzas na acidez do mel. Os dados do presente estudo demonstram que a condutividade elétrica possui uma correlação positiva com a acidez, corroborando com a afirmação de Bogdanov et. al. (1999) e Alves, (2005); contudo o mesmo não foi constatado em relação ao teor de cinzas.

O teor de cinzas indica a quantidade de minerais encontrados no mel (ALVES, 2005); no presente trabalho observou-se que os valores de cinzas variaram entre 0,38% a 4,88%, sendo que a legislação nacional preconiza até 0,6 % de cinzas em amostras de mel de *Apis mellifera* (BRASIL, 2000). Um fator que encontra-se correlacionado com a cor do mel é o conteúdo mineral; de acordo com a constituição do mel, pode-se encontrar uma variedade de espectros e cores diferentes. Esta propriedade, no entanto, pode estar relacionada ao pólen e aos

compostos fenólicos presentes no mel, que varia, por sua vez, em relação a origem geográfica e variedades botânicas visitadas pelas abelhas (MOO-HUCHIN et al., 2015). Em um estudo realizado por Bueno Costa et al. (2016) sobre méis da região sul do Brasil, verificaram que quanto mais claro o mel, menor o conteúdo de compostos fenólicos totais.

O Brasil possui diversidades de biomas e de espécies de abelhas sem ferrão, e para assegurar um perfil de qualidade dos méis é necessária uma melhor caracterização físico-química aumentando o número e localização de amostras considerando manejos de criação e condições ambientais semelhantes.

CONCLUSÕES

Neste estudo podemos concluir que os resultados encontrados para os parâmetros físico-químicos de umidade, cinzas, acidez destoam da atual legislação brasileira. Os fatores ambientais desempenham um importante papel na composição do mel, por isso o conhecimento da variabilidade dos parâmetros permite oferecer ao mercado consumidor um alimento seguro. Sendo necessário buscar um padrão adequado para as espécies de abelhas sem ferrão evitando futuras adulterações na constituição do mel a ser comercializado.

Podemos com este estudo que os resultados encontrados para os parâmetros físico-químicos destoam da atual legislação brasileira. Sendo necessário buscar um padrão adequado para as espécies de abelhas sem ferrão evitando futuras adulterações na constituição do mel a ser comercializado.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Universidade do Estado de Santa Catarina pelo suporte na realização desta pesquisa e aos meliponicultores que cederam as amostras de méis.

Physicochemical characterization of different stingless bee honeys of the Santa Catarina state

ABSTRACT

The stingless bees are social insects that produce honey, geographically found in tropical and subtropical regions. The characteristics of stingless bee honeys are related to different factors such as the bee species that produces it, the nutritional source, the geographic and climatic conditions, as well as the handling of the meliponicultur. And due to the lack of knowledge about the product - honey of stingless bees, honey is not included in national and international honey quality standards. Therefore, the objective of this work was to characterize the physical-chemical parameters of different species of stingless bees from the State of Santa Catarina. The honeys of 7 stingless bee species of different meliponaria were evaluated. The parameters of pH, moisture, water activity, acidity, ash, electrical conductivity and color were investigated. The physico-chemical results were compared with the requirements established by Brazilian legislation and demonstrated that for moisture, ash and acidity, most of the average values are outside the limits established by current legislation. Water activity ranged from 0.67 to 0.78 between species and the pH between 3.37 to 3.93. The data obtained for electrical conductivity allowed to classify the honeys as of floral origin, and the color of the honeys ranged from extra-light amber to dark amber. We can conclude from this study that the results found for physicochemical parameters are not in line with current Brazilian legislation. It is necessary to understand the importance of these parameters to find a suitable pattern for stingless bee species, avoiding future adulterations in the constitution of honey to be commercialized.

KEY WORDS: MELIPONICULTURE, QUALITY, STANDARDIZATION, MANAGEMENT OF HIVES

BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 ALVES, R. M.O.; CARVALHO; C. A. L.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C. 2005. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona manduca* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25: 644-650.
- 2 ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; MATSUDA, A. H.; BASTOS, D. H. M. 2007. Physico-chemical parameters of Amazon *Melipona* honey. *Química Nova*. 30 (3): 707-708.
- 3 ALVAREZ-SUAREZ, J. M. TULIPANI, S. DIA, D. ESTEVEZ, Y. ROMANDINI, S. GIAMPIERI, F. DAMIANI, E. ASTOLFI, P. BOMPADRE, S. BATTINO, M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2490-2499.
- 4 BALLIVIÁN, J.M.P.P. **Abelhas nativas sem ferrão**. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128p.
- 5 BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M.S.; MARIOLI, J.M. 2007. Comparison of the antibacterial activity of honey from different prevariance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*. 124; 375-381.
- 6 BIANCHI, E. M. La miel, características y composición – Análisis y Adulteraciones. Santiago del Estero, Argentina: UNSE – CEDIA, 1981.
- 7 BOGDANOV, S. 1999. Honey quality and international regulatory standards: review by International Honey Commission. *Bee World*. 80(2): 61-69.
- 8 BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LÜLLMANN, C. 1997. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, extra issue, p. 1-59.
- 9 BUENO-COSTA, F. M; ZAMBIAZI, R. C.; BOHMER, B.; CHAVES, F. C.; SILVA, W. P. da; ZANUSSO, J. T.; DUTRA, I. 2016. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Science and Technology*. 65: 333-340.

- 10 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. MAPA, Brasília, 2000.
- 11 CAMPOS, F. S., GOIS, G. C., CARNEIRO, G. G. 2010. Physico-chemical parameters of the honey of stingless bee *Melipona scutellaris* produced in the Paraíba. *Zootecnia.*, 7: 186 e 190.
- 12 CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. 2016. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). *Food Chemistry*. 192:149–155.
- 13 CRANE, E. **Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources**. Oxford, UK: Heinemann Newnes. 1990.
- 14 EKHTELAT, M.; RAVAJI, K.; PARVARI, M. 2016. Effect of Iranian *Ziziphus* honey on growth of some foodborne pathogens. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 7: 54-57.
- 15 HOFFMANN, F. L., Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos, **Brasil Alimentos**, São José do Rio Preto, SP, v. 9, n. 1, p.23-30, 2001.
- 16 HUSSAIN, M. B.; HANNAN, A.; AKHTAR, N.; FAYYAZ, G. Q.; IMRAN, M.; SALEEM, S.; QURESHI, I. A. 2015. Evaluation of the antibacterial activity of selected Pakistani honeys against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:32.
- 17 INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: IMESP, 2008.
- 18 KWAKMAN, P.H.S.; TE VELDE, A.A.; DE BOER, L.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; ZAAT, S.A.J. Two Major Medicinal Honeys Have Different Mechanisms of Bactericidal Activity. *PLoS ONE*. v.6, n.3, 2011.

- 19 LAGE, L. G.A., COELHO, L. L.; RESENDE, H. C.; TAVARES, M. G.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. 2012 Honey physicochemical properties of three species of the brazilian *Melipona*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84: 605-608.
- 20 LAALLAM, H.; BOUGHEDIRI, L.; BISSATI, S.; MENASRIA, T.; MOUZAOU, M.S.; HADJADJ, S.; HAMMOUDI, R.; CHENCHOUNI, H. Modeling the synergistic antibacterial effects of honey characteristics of different botanical origins from the Sahara Desert of Algeria. *Frontiers in Microbiology*. v.6, 1239, 2015.
- 21 MAVRIC, E.; WITTMANN, S.; BARTH, G.; HENLE, T. 2008. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52:483–489.
- 22 MICHENER, C. D. 2013. The Meliponini. In P. Vit et al. (Eds.), *Pot-honey a legacy of stingless bees* (pp. 3–17). New York: Springer.
- 23 Moo-HUCHIN, V. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; LIRA-MAAS, J. D.; PÉREZ-PACHECO, E.; ESTRADA-LEÓN, R.; Moo-HUCHIN, M. I.; SAURI-DUCH, E. 2015. Physicochemical Properties of *Melipona beecheii* Honey of the Yucatan Peninsula. *Journal of Food Research*. v.4, n.5.
- 24 NISHIO, E. K.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; PRONI, E. A.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. 2016. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Scientific Reports*. 6:21641.
- 25 PERALTA, Edna Dória. 2010. **Atividade antimicrobiana e composição química de méis do Estado da Bahia**. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 265f.

26 WASFI, R.; ELKHATIB, W.F.; KHAIRALLA, A.S. Effects of Selected Egyptian Honeys on the Cellular Ultrastructure and the Gene Expression Profile of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*. 0150984, 2016.

MANUSCRITO III**Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana do mel de *Melipona bicolor***Thaisa Francielle Topolski Pavan Batiston¹Denise Nunes Araújo²

¹ Mestranda em Zootecnia. Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Zootecnia, campus Chapecó. E-mail: thaisapavan@yahoo.com.br

² Doutora em Zootecnia. Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Zootecnia, campus Chapecó. E-mail: dnaraújo@hotmail.com

RESUMO

O perfil de resistência bacteriana é um problema desafiador agravado nos últimos anos pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal e saúde humana. O mel é um produto natural com propriedades terapêuticas, dentre elas a antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química e a atividade antimicrobiana do mel produzido pela abelha sem ferrão *Melipona bicolor* contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados físico-químicos apresentaram valores médios de pH 3,38, teor de umidade 30,08%, teor de cinzas 1,36%, acidez 46,58 mEq.kg⁻¹, a atividade de água 0,74, condutividade elétrica (189,56 µS.cm⁻¹), e a cor classificada como âmbar extra claro. Para a atividade antimicrobiana observou-se que na presença de diferentes concentrações de mel a bactéria estudada apresentou maior sensibilidade que quando exposta somente aos antimicrobianos Amoxicilina/Ácido clavulânico, Ceftadizima, Gentamicina, Tetraciclina e Ciprofloxacina. Conclui-se que este estudo aponta para o potencial terapêutico do mel, em especial a sua atividade antimicrobiana.

PALAVRAS-CHAVE: RESISTÊNCIA MICROBIANA, QUALIDADE, ANTIBIÓTICOS, MELIPONINAE.

INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão são insetos sociais, pertencem a ordem Hymenoptera e a família Apidae (Meliponini), estas espécies estão intimamente ligadas às regiões tropicais e subtropicais [1,2,3].

O mel é um produto natural reconhecido na medicina tradicional mundial, O seu potencial antimicrobiano e perfil físico-químico do mel estão relacionados com a localização geográfica, com as condições climáticas, e com a variação da fonte nutricional da colméia durante as estações do ano [4,5,6,7,8,9,10,11,12,13].

No Brasil é muito comum o uso de fitoterápicos e xaropes caseiros com o uso do mel em terapias populares, principalmente por indígenas e zonas rurais, pela crença que este tipo de mel possui propriedades curativas [15,16,17].

Atualmente em função da preocupação generalizada pela crescente emergência de patógenos resistentes, o mel vem tendo destaque como uma alternativa para sensibilização de microrganismos resistentes à antibióticos e, principalmente, por ser um produto natural [18,19,20]. Todavia, os dados sobre a atividade antimicrobiana de méis brasileiros ainda é limitada [21,22]. Desta forma, o estudo objetivou avaliar os parâmetros físico-químicos e a atividade antimicrobiana do mel de *Melipona bicolor* contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras

As amostras de mel de abelha sem ferrão *Melipona bicolor* foram coletadas em Chapecó, estado de Santa Catarina, totalizando 3 amostras de méis. O período de coleta foi entre dezembro 2016 e fevereiro de 2017, após as amostras permaneceram armazenadas sob

refrigeração e protegidas da luz em frascos plásticos estéreis com fechamento hermético.

Análises Físico-químicas

A umidade das amostras foi determinada por refratômetro, com os valores expressos em °Brix, a partir do qual foi calculado o valor da umidade (%) [23]. A atividade de água (A_w) foi determinada por meio do aparelho AquaLab Série 3 modelo TE, que utiliza a técnica de determinação do ponto de orvalho em espelho encapsulado[23]. Para determinação do teor de cinzas procedeu-se segundo IAL [24]. O pH, a acidez e a condutividade elétrica das amostras foram analisadas de acordo com a recomendação Bogdanov et al. [25]. A determinação da cor foi realizada conforme metodologia descrita por Bianchi [26].

Atividade antimicrobiana

A padronização do inóculo de *Escherichia coli* ATCC 25922 seguiu-se de acordo com o descrito por CLSI [27], para posteriormente avaliar o perfil de resistência antimicrobiana da *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizando o método de disco difusão [27] e Brasil [28]. Os discos de antimicrobianos (Laborclim) utilizados foram: Amoxicilina/Ácido clavulânico (AMC 20 μ g + 10 μ g), Cefadizima (CAZ 30 μ g), Gentamicina (GEN 10 μ g), Tetraciclina (TET 30 μ g) e Ciprofloxacina (CIP 5 μ g). E avaliação da atividade antimicrobiana do mel a partir da técnica de poço [29].

Disco difusão em ágar

Utilizando-se de um swab estéril umedecido na suspensão bacteriana padronizada, o inóculo foi semeado de forma suave em todas as direções da placa de petri contendo ágar Muller-Hinton (Kasvi). A colocação dos discos de antimicrobianos nas placas de petri procedeu-se com auxílio de uma pinça flambada e resfriada. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após mensurou-se o diâmetro dos halos em milímetros com auxílio de régua milimetrada, a partir da zona de inibição formada ao redor dos discos de acordo com CLSI [30].

Difusão em ágar pela técnica do poço

O meio de cultura utilizado foi ágar Muller Hinton (Kasvi). A *Escherichia coli* ATCC 25922 foi inoculada na superfície com o uso de um swab; procedeu-se a perfuração dos poços utilizando um molde estéril com diâmetro de 6 mm. O volume total dispensado foi de 100 µl/poço nas respectivas concentrações de 417,3 mg/mL (25%), 550,84 mg/mL (37,5%), 924, 61 mg/mL (50%), 1312,84 mg/mL (75%) (p/v) e 1525,09 mg/mL (100%). Como controle (sem adição de mel), um poço foi preenchido com 100 µL de água destilada autoclavada. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas, para posterior leitura dos halos com auxílio de régua milimetrada.

Análise estatística

As médias das triplicatas das análises físico-químicas apresentam-se com seu respectivo desvio padrão. Para a análise do perfil de resistência antimicrobina apresentam-se os valores de halos em milímetros. E para a atividade antimicrobiana do mel, as médias dos halos de inibição foram agrupadas com o seu respectivo desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de umidade do mel de *Melipona bicolor* foi de 30,08% ($\pm 1,58$), acima de 20%, parâmetro considerado ideal pela legislação brasileira [32]. Entretanto, tal diferença não influenciou negativamente a capacidade inibitória de crescimento dos microrganismos. O estudo de Alves et al. [33], que verificou que abelhas sem ferrão, mesmo em clima seco, produzem mel com alta umidade. Méis com baixo teor de umidade terão uma pequena quantidade de peróxido de hidrogênio, que é conhecido por evitar o crescimento microbiano [8,34].

O valor de pH apresentado neste trabalho foi de 3,38 ($\pm 0,20$). Campos et al. [36] comenta que o pH é um parâmetro que auxilia na avaliação da acidez total e sua variação pode estar

relacionada à composição nutricional da dieta da abelha e das suas substâncias mandibulares.

O alto teor de atividade de água de 0,72 ($\pm 0,04$) poderia favorecer o crescimento de microrganismos, segundo Lage, et al., [37], valores inferior a 0,6 asseguraria uma baixa proliferação microbiana [38].

A partir da condutividade apresentada de 198.56 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, podemos classificar o mel como obtido de fontes florais. Este parâmetro encontra-se intimamente relacionado à concentração de minerais, ácidos orgânicos e proteínas, demonstrando grande variabilidade da fonte floral do mel [33,14,31]. Nascimento et al. [31] encontraram valores entre 586,20 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e 539,60 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ para diferentes espécies de meliponídeos no Brasil.

O teor de acidez encontrado neste trabalho foi de 46,58 ($\pm 17,58$) $\text{mEq}\cdot\text{kg}^{-1}$ e está em conformidade com a legislação. Peralta [35] encontrou valores distintos de acidez para as meliponíneos, de 17,8 a 116,7 $\text{meq}\cdot\text{Kg}^{-1}$, semelhante aos dados obtidos.

O teor de cinzas indica a quantidade de minerais encontrados no mel [33]; no presente trabalho observou-se teor de 1,36% ($\pm 1,50$), sendo que a legislação nacional preconiza até 0,6 % [32]. A classificação de cor obtida do mel de *Melipona bicolor* foi de âmbar extra claro.

O perfil de resistência antimicrobiana da *Escherichia coli* ATCC 25922 apresentado na Figura 1, mostrou sensibilidade para todos os antimicrobianos testados (tabela 1).

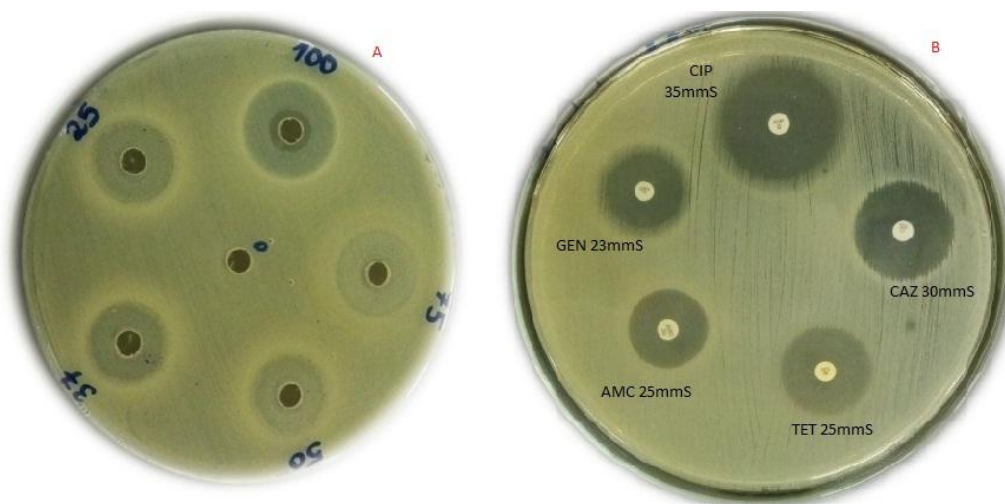


Figura 3 – Efeito da atividade antimicrobiana do mel de *Melipona bicolor* (A) e o Perfil da atividade antimicrobiana da *Escherichia coli* ATCC 25922 (B).

Para o teste de difusão utilizando a técnica do poço, com a presença de diferentes concentrações de mel de *Melipona bicolor* verificou-se que o perfil de sensibilidade não foi alterado, sendo que a maior atividade foi para a concentração de 100, 75 e 50% respectivamente (tabela 1).

Tabela 1 O perfil de resistência antimicrobiana da *Escherichia coli* ATCC 25922 de acordo com CLSI (2005) e a atividade antimicrobiana do mel de *Melipona bicolor*, através da medida do diâmetro dos halos de inibição (mm)

	Antibiótico* (CLSI, 2005)		% de mel no poço	<i>Melipona bicolor</i>
<i>Escherichia coli</i>	AMC	25 S	100	28,75 ($\pm 2,5$)
<i>ATCC 25922</i>	CAZ	30 S	75	26,25 ($\pm 2,5$)
	GEN	23 S	50	25 ($\pm 4,1$)
	TET	25 S	37,5	22,5 ($\pm 2,9$)
	CIP	35 S	25	22,9 ($\pm 2,9$)

Valores entre parênteses (\pm DP).

*AMC - Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC 20 μ g + 10 μ g); CAZ – Ceftadizima (CAZ 30 μ g); GEN - Gentamicina (GEN 10 μ g); TET – Tetraciclina (TET 30 μ g); CIP - Ciprofloxacina (CIP 5 μ g).

** R – Resistente; I – Intermediário; S – Sensível.

Os resultados corroboram com Basualdo et al. [39], onde o efeito bactericida do mel é

dependente da concentração do mel utilizado e a natureza das bactérias.

CONCLUSÃO

A caracterização físico-química do mel de *Melipona bicolor* apresenta valores que estão fora dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira. No entanto, é uma característica intrínseca das espécies Meliponinae. O mel possui característica de ser antimicrobiano, para o presente estudo não houve alteração do perfil de sensibilidade, mas observa-se que o melhor efeito é dependente da concentração de mel empregada

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Universidade do Estado de Santa Catarina pelo suporte na realização desta pesquisa e aos meliponicultores que cederam as amostras de méis. E a CAPES pela incentivo através de bolsa de estudos.

ABSTRACT

The bacterial resistance profile is a challenging problem aggravated in recent years by the indiscriminate use of antimicrobials in animal production and human health. Honey is a natural product with therapeutic properties, among them antimicrobial. The objective of this work was to perform the physico-chemical characterization and antimicrobial activity of honey produced by the stingless honey bee *Melipona bicolor* against *Escherichia coli* ATCC 25922. The physico-chemical results presented average values of pH 3.38, moisture content 30.08 %, ash content 1.36%, acidity 46.58 mEq.kg⁻¹, water activity 0.74, electrical conductivity (189.56 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), and color classified as extra light amber. For the antimicrobial activity, it was observed that in the presence of different concentrations of honey, the bacterium studied showed a higher sensitivity than when exposed only to the Amoxicillin / Clavulanic Acid, Cefadizime, Gentamicin, Tetracycline and Ciprofloxacin antimicrobials. It

is concluded that this study points to the therapeutic potential of honey, especially its antimicrobial activity.

KEY WORDS: MICROBIAL RESISTANCE, QUALITY, ANTIBIOTICS, MELIPONINAE.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- [1] CRANE, E. 1990. **Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources**. Oxford, UK: Heinemann Newnes.
- [2] MICHENER, C. D. 2013. The Meliponini. In P. Vit et al. (Eds.), Pot-honey a legacy of stingless bees (pp. 3–17). New York: Springer.
- [3] CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. 2016. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**. v.192 p.149–155.
- [4] MAVRIC, E.; WITTMANN, S.; BARTH, G.; HENLE, T. 2008. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **Mol Nutr Foods Res**.52:483–489.
- [5] SHERLOCK, O.; DOLAN, A.; ATHMAN, R.; POWER, A.; GETHIN, G.; COWMAN, S.; HUMPHREYS, H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 10:47.
- [6] KWAKMAN, P.H.S.; TE VELDE, A.A.; DE BOER, L.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; ZAAT, S.A.J. 2011. Two Major Medicinal Honeys Have Different Mechanisms of Bactericidal Activity. **PLoS ONE**. v.6, n.3.

- [7] HUSSAIN, M. B.; HANNAN, A.; AKHTAR, N.; FAYYAZ, G. Q.; IMRAN, M.; SALEEM, S.; QURESHI, I. A. 2015. Evaluation of the antibacterial activity of selected Pakistani honeys against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.15, p.32.
- [8] LAALLAM, H.; BOUGHEDIRI, L.; BISSATI, S.; MENASRIA, T.; MOUZAOU, M.S.; HADJADJ, S.; HAMMOUDI, R.; CHENCHOUNI, H. 2015. Modeling the synergistic antibacterial effects of honey characteristics of different botanical origins from the Sahara Desert of Algeria. **Frontiers in Microbiology**. v.6, 1239.
- [9] NISHIO, E. K.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; PRONI, E. A.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. 2016. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific Reports**. v.6, 21641.
- [10] EKHTELAT, M.; RAVAJI, K.; PARVARI, M. 2016. Effect of Iranian Ziziphus honey on growth of some foodborne pathogens. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**. v.7, p.54-57.
- [11] WASFI, R.; ELKHATIB, W.F.; KHAIRALLA, A.S. 2016. Effects of Selected Egyptian Honeys on the Cellular Ultrastructure and the Gene Expression Profile of *Escherichia coli*. **PLoS ONE**. 0150984.
- [12] TEMARU, E.; SHIMURA, S.; AMANO, K.; KARASAWA, T. 2007. Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera: Apidae; Meliponinae). **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, p. 281-285.
- [13] BALLIVIÁN, J.M.P.P. 2008. **Abelhas nativas sem ferrão**. São Leopoldo: Oikos, 128p.
- [14] SUNTIPARAPOP, K.; PRAPAIPONG, P.; CHANTAWANNAKUL, P. 2012 Chemical and biological properties of honey from Thai stingless bee (*Tetragonula leaviceps*), **Journal of Apicultural Research**, 51:1, 45-52.

- [15] POSEY, D. A., Etnoentomologia de tribos indígenas da Amazonia. 1987. In: **RIBEIRO, D. Suma etnológica brasileira: Etnobiologia**, 2.ed. Petrópolis: **FINEP**, v.1, p.251-271.
- [16] CORTOPASSI-LAURINO, M., GELLI D. S., 1991. 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.
- [17] MADALENO, Isabel. Plantas medicinais consumidas em Cochim, no século XVI e na atualidade. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. 2015. **Ciências Humanas**, v. 10, n. 1, p. 109-142.
- [18] BOORN, K. L.; KHOR, Y. -Y.; SWEETMAN, E.; TAN, F.; HEARD, T.A.; HAMMER, K.A. 2010. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **J Appl Microbiol.** 108, 1534–1543.
- [19] PIMENTEL, R. B. DE Q.; COSTA, C. A. DA; ALBUQUERQUE, P. M.; DUVOISIN JUNIOR, S. 2013. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 151.
- [20] CAMPEAU, M. E. M.; PATEL, R. 2014. Antibiofilm Activity of Manuka Honey in Combination with Antibiotics. **International Journal of Bacteriology.** ID 795281, p.7.
- [21] NISHIO, E. K.; KRUPINISKI, M. T.; KOBAYASHI, R. K. T.; PRONI, E. A.; NAKAZATO, G. 2014. Avaliação da Atividade Antibacteriana de Dois Méis de Abelhas Indígenas Sem Ferrão Contra Bactérias de Importância Alimentar. In: **Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos – MICROAL. n.1, v.1.** São Paulo.
- [22] BUENO-COSTA, F. M.; ZAMBIAZI, R. C.; BOHMER, B.; CHAVES, F. C.; SILVA, W. P. da; ZANUSSO, J. T.; DUTRA, I. 2016. Antibacterial and antioxidant activity of honeys

from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**. v65, p 333-340.

- [23] ANACLETO, D. A.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C. 2009. 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.
- [24] INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: IMESP, 2008.
- [25] BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LÜLLMANN, C. 1997. Harmonised methods of the European Honey Commission. **Apidologie**, extra issue, p. 1-59.
- [26] BIANCHI, E. M. 1981. La miel, características y composición – Análisis y Adulteraciones. Santiago del Estero, Argentina: **UNSE – CEDIA**.
- [27] CLSI. 2015. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Wayne, PA, USA.
- [28] BRASIL. 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. 8. ed., v. 23, n.1.
- [29] PEREZ, C., M. PAULI, P. BAZERQUE, 1990. An antibacterial assay by agar well diffusion method. *Acta Bio-Medica*. Exp.
- [30] CLSI. 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. M100-S15. Wayne, PA, USA.
- [31] NASCIMENTO, A. S. DO; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. DE, ARAÚJO, D. F. D.; OLINDA, R. A.; SILVEIRA, T. A. DA. 2015. Physical-Chemical Parameters of Honey of Stingless Bee (Hymenoptera: Apidae). **American Chemical Science Journal**. 7(3): 139-149.

- [32] BRASIL. 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. MAPA, Brasília.
- [33] ALVES, R. M.O.; CARVALHO; C. A. L.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C. 2005. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona manduca* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p. 644-650.
- [34] BOGDANOV S., BLUMER P. 2001. Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Rev. Suisse Agric.* 98, 107–114.
- [35] PERALTA, Edna Dória. .2010 **Atividade antimicrobiana e composição química de méis do Estado da Bahia**. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010. Feira de Santana. 265f.
- [36] CAMPOS, F. S., GOIS, G. C., CARNEIRO, G. G. 2010. Physico-chemical parameters of the honey of stingless bee *Melipona scutellaris* produced in the Paraíba. **Zootecnia**, 7, p. 186 e 190.
- [37] LAGE, L. G.A., COELHO, L. L.; RESENDE, H. C.; TAVARES, M. G.; CAMPOS, L.A.O.; FERNANDES-SALOMÃO, T.M. 2012 Honey physicochemical properties of three species of the brazilian *Melipona*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84: 605-608.
- [38] HOFFMANN, F. L., 2001. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos, **Brasil Alimentos**, São José do Rio Preto, SP, v. 9, n. 1, p.23-30.
- [39] BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M.S.; MARIOLI, J.M. 2007. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**, v.124, n. 3-4, p. 375-381, 2007.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, podemos concluir que os méis avaliados de diferentes espécies de abelha sem ferrão possuem atividade antimicrobiana. Esta atividade antimicrobiana está relacionada com o tipo de mel, suas características físico-químicas e a concentração utilizada para sensibilizar tanto cepas de isolados bacterianos como cepas de referência bacteriana. Outro fator a considerar em relação ao efeito inibitório do mel é a técnica empregada. Para o ensaio de difusão em ágar pela técnica de poço os resultados foram satisfatórios, as cepas bacterianas apresentaram sensibilidade quando expostas somente aos méis de abelha sem ferrão, no entanto, não é a melhor técnica a ser empregada. Os resultados da menor concentração inibitória mínima (25%) confirmaram que o mel foi capaz de inibir o crescimento das diferentes cepas bacterianas empregadas neste estudo. Portanto, concluímos que o mel é uma

alternativa promissora capaz de sensibilizar microrganismos, não só para a saúde humana, mas também para a saúde animal. Além disso, é necessário entender a importância dos parâmetros físico-químicos para buscar um padrão adequado de qualidade para os méis de abelhas sem ferrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVIČ, H.; JAMNIK, M.; BURKAN, L.; KAČ.M. Water activity and water content in Slovenian honeys. **Food Control**, v. 19, n. 11, p. 1086–1090, 2008.

AHMED, S. e OTHMAN, N. H. Review of the Medicinal Effects of Tualang Honey and a Comparison with Manuka Honey. **Malays J Med Sci**. May-Jul 2013; 20(3): 6-13.

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

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; MATSUDA, A. H.; BASTOS, D. H. M. Physico-chemical

parameters of Amazon *Melipona* honey. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 707-708, 2007.

ALQARNI, A. S., OWAYSS, A. A., MAHMOUD, A. A., & HANNAN, M. A. (2014). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**. 18, 618–625.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. TULIPANI, S. DIA, D. ESTEVEZ, Y. ROMANDINI, S. GIAMPIERI, F. DAMIANI, E. ASTOLFI, P. BOMPADRE, S. BATTINO, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2490-2499, 2010.

ALVES, D.F.S., CABRAL JÚNIOR, F.C.; CABRAL, P.P.A.C.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.M.; REGO, A.C.M.; MEDEIROS, A.C. Efeito da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.53, 2008.

ALVES, R. M.O.; CARVALHO; C. A. L.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p. 644-650, 2005.

ANACLETO, D. A.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. 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.

BALLIVIÁN, J.M.P.P. **Abelhas nativas sem ferrão**. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128p.

BARTH, Ortrud Monika. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia agrícola**. v. 61, n. 3, p. 342-350, 2004 .

BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M.S.; MARIOLI, J.M. Comparison of the antibacterial activity of honey from different prevanance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**, v.124, n. 3-4, p. 375-381, 2007.

BAZONI, M. 2012. Atividade antimicrobiana dos méis produzidos por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil. 116f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

BILUCA, Fabíola Carina. **Caracterização química e influência do tratamento térmico em méis de abelha sem ferrão (*Meliponinae* spp.) produzidos no Estado de Santa Catarina.** 2014. 110p. Dissertação (Mestrado Ciências dos alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BOGDANOV, S. Harmonized Methods of the International Honey Commission. Bern, Switzerland: **Swiss Bee Research Centre**, 2002.

BOGDANOV, S., RUOFF, K., PERSANO-ODDO, L., Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review, **Apidologie**, Roma, Italy, v.35, p S54-S17, 2004.

BOGDANOV, S.; JURENDIC, T.; SIEBER, R.; GALLMAN, P. Honey for nutrition and health: a review. **American Journal of the College of Nutrition**, v.27, p. 677-689, 2008.

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

BOORN, K. L.; KHOR, Y. -Y.; SWEETMAN, E.; TAN, F.; HEARD, T.A.; HAMMER, K.A. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **J Appl Microbiol.** 2010. 108 (2010) 1534–1543.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 346, de 16 de agosto de 2004. **Disciplina a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários.** CONAMA, Brasília, DF, 2004.

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

BUENO-COSTA, F. M.; ZAMBLAZI, R. C.; BOHMER, B.; CHAVES, F. C.; SILVA, W. P. da; ZANUSSO, J. T.; DUTRA, I. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**. Volume 65, January 2016, Pages 333-340.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. . Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. **Apidologie** (Celle), v. 23, p. 509-522, 1992.

CAMPEAU, M. E. M.; PATEL, R. Antibiofilm Activity of Manuka Honey in Combination with Antibiotics. **International Journal of Bacteriology**. 2014. Article ID 795281, p.7.

CAMPOS, F. S., GOIS, G. C., CARNEIRO, G. G. (2010). Physico-chemical parameters of the honey of stingless bee *Melipona scutellaris* produced in the Paraíba. **Zootecnia**, 7, p. 186 e 190.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**. v.192 p.149–155. 2016.

CODEX ALIMENTARIUS. Revised codex standard for honey. Rev. 2 [2001]. 24th session of the Codex Alimentarius in 2001. Disponível em: [http/ www.codexalimentarius. net/standard](http://www.codexalimentarius.net/standard). Acesso: 20 de outubro de 2003.

COOPER, R. A.; MOLAN, P. C.; HARDING, K. G. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. **J R Soc Med**. 92, 283–285. 1999.

CORTOPASSI-LAURINO M, IMPERATRIZ-FONSECA VL, ROUBIK DW, DOLLIN A, HEARD T, INGRID AGUILAR I, et al. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**. 2006; 37(2):275–92.

CORTOPASSI-LAURINO, M., 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, E. **Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources**. Oxford, UK: Heinemann Newnes. 1990.

CRANE, E., **O livro do mel**. São Paulo, Ed. Nobel, 226 pp., 1987.

DA SILVA, P.M., GAUCHE, C., GONZAGA, L.V., OLIVEIRA COSTA, A.C., FETT, R.. Honey: Chemical composition, stability and authenticity, **Food Chemistry** 196 (2016) 309–323.

DASH, N., PANIGRAHI, D. AND AL-ZAROUNI, M. (2016) Antimicrobial Effect of Honey from the Arabian Gulf Region against Bacterial Isolates from Pus and Wound Swabs. **Advances in Microbiology**, 6, 745-752.

EKHTELAT, M.; RAVAJI, K.; PARVARI, M. Effect of Iranian Ziziphus honey on growth of some foodborne pathogens. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**. v.7, p.54-57, 2016.

ETERAF-OSKOU EI, T.; NAJAFI, M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. **Iran J. Basic. Med. Sci.**, v.16, p. 731-742, 2013.

FEÁS, X.; PIRES, J.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, M. L. Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. **Food and Chemical Toxicology**. n.48, p. 3462–3470, 2010.

GAITANIS, G.; MAGIATIS, P.; HANTSCHKE, M.; BASSUKAS, I.D.; VELEGRAKI, A. The *Malassezia* genus in skin and systemic disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.25, p. 106-141, 2012.

GÁMBARO, A., ARES, G., GIMÉNEZ, A., & PAHOR (2007). Preference mapping of color of Uruguayan honeys. **Journal of Sensory Studies**, 22, 507–519.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of stingless bee *Trigona* spp and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. **Thermochim Acta**, v.415, p.99-106, 2004.

GONÇALVES, A. L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H., Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, meliponini). **Arquivo Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, 2005.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p. 455-459, 2005.

GONSALVES, P.E. **Alimentos que curam**. São Paulo, Instituição Brasileira de Difusão Cultural (IBRASA), 2004.

GUERRINI, A.; BRUNI, R.; MAIETTI, S.; POLLI, C.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; SCALVENZI, L.; SACCHETTI, G. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, v. 144, p. 1413-1420, 2009.

HABIB, H.M., AL MEQBALI, F.T., KAMAL, H., SOUKA, U.D., IBRAHIM, W.H., 2014. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. *Food Chem.* 153, 28–34.

HOFFMANN, F. L., Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos, **Brasil Alimentos**, São José do Rio Preto, SP, v. 9, n. 1, p.23-30, 2001

HUSSAIN, M. B.; HANNAN, A.; AKHTAR, N.; FAYYAZ, G. Q.; IMRAN, M.; SALEEM, S.; QURESHI, I. A. Evaluation of the antibacterial activity of selected Pakistani honeys against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.15, p.32, 2015.

IRISH, M.; CARTER, D.A.; SHOKOHI, T.; BLAIR, S.E. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. **Med. Mycol.**, v.44, p. 289-291, 2006.

JAFFÉ, R.; POPE, N.; CARVALHO, A.T.; MAIA, U.M.; BLOCHTEIN, B.; DE CARVALHO, C.A.L, et al. (2015) Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **PLoS ONE** 10(3): e0121157.

JENKINS R., BURTON N., COOPER R. (2013). Proteomic and genomic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) exposed to manuka honey *in vitro* demonstrated down-regulation of virulence markers. **J. Antimicrobial Chemother.** 69 603–615. 10.1093.

KEK, S. P., CHIN, N. L., YUSOF, Y. A., TAN, S. W. AND CHUA, L. S., Total phenolic contents and colour intensity of Malaysian honeys from the *Apis* spp. and *Trigona* spp. bees. **Agric. Agric. Sci. Procedia**, 2014, **2**, 150–155.

KERR, W.E. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção do mel, pólen, geoprópolis e cera. **Informe Agropecuário**, v.13, n.149, p. 15-22, 1987.

KHALIL, I. M. D.; SULAIMAN, S. A.; ALAM, N., Content and antioxidant properties of processed Tualang honey (AgroMas®) collected from different regions in Malaysia. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, 2012, **4**, 214–219.

KHALIL, M. I. ALAM, N. MONIRUZZAMAN, M. SULAIMAN, S. A. GAN, S. H. Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C921, 2011.

KISHORE, R. K.; HALIM, A. S.; SYAZANA, M. N.; SIRAJUDEEN, K. N. S. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. **Nutr.Res.**, 2011, **31**, 322–325.

KIVRAK, Seyda; KIVRAK, İbrahim; KARABABA, Ersan; 2017. Characterization of Turkish honeys regarding of physicochemical properties, and their adulteration analysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 37: 80-89.

DEVASVARAN, K. and YONG, YOKE-KEONG. Anti-inflammatory and wound healing properties of Malaysia Tualang honey. **Current Science**. v. 110, n. 1, 2016.

KOWALSKI S., ŁUKASIEWICZ M., BERSKI W., 2013. Applicability of physico-chemical parameters of honey for identification of the botanical origin. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.** 12(1), 51-59.

KUMAR, A.; SHARMA, V.K.; SINGH, H.P.; PRAKASH, P.; SINGH, S.P. Efficacy of some indigenous drugs in tissue repair in buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v.70, p.42-44, 1993.

KUROISHI, A. M.; QUEIROZ, M. B.; ALMEIDA, M. M. de; QUAST, L. B. Avaliação da cristalização de mel utilizando parâmetros de cor e atividade de água. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 84-91, jan./mar. 2012.

KWAKMAN, P.H.S.; TE VELDE, A.A.; DE BOER, L.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; ZAAT, S.A.J. Two Major Medicinal Honeys Have Different Mechanisms of Bactericidal Activity. **PLoS ONE**. v.6, n.3, 2011.

LAALLAM, H.; BOUGHEDIRI, L.; BISSATI, S.; MENASRIA, T.; MOUZAOU, M.S.; HADJADJ, S.; HAMMOUDI, R.; CHENCHOUNI, H. Modeling the synergistic antibacterial effects of honey characteristics of different botanical origins from the Sahara Desert of Algeria. **Frontiers in Microbiology**. v.6, 1239, 2015.

LEGLER, S. **Inspeção e controle de qualidade do mel**. 2000. 34p.

LIBERATO, Maria da Conceição Tavares Cavalcanti et al . Physicochemical properties and mineral and protein content of honey samples from Ceará state, Northeastern Brazil. **Food Sci. Technol (Campinas)**, Campinas , v. 33, n. 1, p. 38-46, Mar. 2013 .

LIBONATTI, C., SOLEDAD, V., & MARINA, B. (2014). Antibacterial activity of honey: A review of honey around the world. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, 6(3), 51-56.

MADALENO, Isabel. Plantas medicinais consumidas em Cochim, no século XVI e na atualidade. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. **Ciências Humanas**, v. 10, n. 1, p. 109-142, jan.-abr. 2015.

MAVRIC, E.; WITTMANN, S.; BARTH, G.; HENLE, T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **Mol Nutr Foods Res**. 2008;52:483–489.

MENDES, C. DE G.; SILVA, J. B. A. DA.; MESQUITA, L. X. DE; MARACAJÁ, P. B. As análises de mel: revisão. **Caatinga** (Mossoró,Brasil), v.22, n.2, p.07-14. 2009.

MERCÊS, M. D.; PERALTA, E. D.; UETANABARO, A. P. T.; LUCCHESI, A. M. Atividade antimicrobiana de méis de cinco espécies de abelhas brasileiras sem ferrão. **Cienc. Rural**. vol.43, no.4, p.672-675. 2013.

MICHENER, C. D. (2013). The Meliponini. In P. Vit et al. (Eds.), *Pot-honey a legacy of stingless bees* (pp. 3–17). New York: Springer.

MICHENER, C. D. *The bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2007.

MOLAN, P. C. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. **American Journal of Clinical Dermatology**. v. 2, n.1, p.13-19, 2001.

MULLER, P.; ALBER, D.G.; TURNBULL, L.; SCHLOTHAUER, R.C.; CARTER,D.A.; WHITCHURCH, C.B. et al. Synergism between Medihoney and rifamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Plos One**, v.8, e.57679, 2013.

NISHIO, E. K.; KRUPINISKI, M. T.; KOBAYASHI, R. K. T.; PRONI, E. A.; NAKAZATO,

G. Avaliação da Atividade Antibacteriana de Dois Méis de Abelhas Indígenas Sem Ferrão Contra Bactérias de Importância Alimentar. In: **Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos – MICROAL. n.1, v.1.** São Paulo, 2014.

NISHIO, E. K.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; PRONI, E. A.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific Reports.** v.6, 21641, 2016.

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

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

ÖZCAN, M. M.; ÖLMEZ, C. Some qualitative properties of different monofloral honeys. **Food Chemistry,** n. 163, p. 212–218, 2014.

PERALTA, Edna Dória. **Atividade antimicrobiana e composição química de méis do Estado da Bahia.** Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010. Feira de Santana, 2010. 265f.

PEREIRA, Luzimario Lima. 2010. **Análise físico-químico de amostras de méis de Apis mellifera e Meliponíneos.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010. 84p.

PERSANO-ODDO, L.; HEARD, T. A.; RODRÍGUEZ-MALAVAR, A.; PÉREZ, R. A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.; SANCHO, M. T.; SESTA, G.; LUSCO, L.; VIT, P. Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. **Journal of Medicinal Food.** v.11,n.4, p.789-794. 2008.

PIMENTEL, R. B. DE Q.; COSTA, C. A. DA; ALBUQUERQUE, P. M.; DUVOISIN JUNIOR, S. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless

bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.13, n.151, 2013.

POSEY, D. A., Etnoentomologia de tribos indígenas da amazonia. **In: RIBEIRO, D. Suma etnológica brasileira: Etnobiologia**, 2.ed. Petrópolis: **FINEP**, v.1, p.251-271,1987.

RABIE, E.; SEREM, J. C.; OBERHOLZER, H. M.; GASPAR, A. R. M; BESTER, M. J. How methylglyoxal kills bacteria: An ultrastructural study. *Ultrastructural Pathology*. 2016; 40(2):107-11.

RIBEIRO, R.O.R; SILVA, C.; MONTEIRO, M.L.; BAPTISTA, R.F.; GUIMARÃES, C.F.; MÁRSICO, E.T.; MANO, S.B.; PARDI, H.S. Comparative evaluation of physical-chemical quality inspected and illegal honey marketed in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Science*. 2009;16(1)3-7.

RICHTER, W.; JANSEN, C.; VENZKE, T. S. L.; MENDONÇA, C. R. B.; BORGES, C. D. Avaliação da qualidade físico-química do mel produzido na cidade de Pelotas/RS. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v.22, n.4, p. 547-553. 2011.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 391-397, 2010.

SEPEHR, S. The most important medicinal uses of honey, and its side effects in the book of the Canon by Avicenna, and in the modern medical literature: a comparative study. **J. ApiProd ApiMed Sci**. v.2, n.43. 2010.

SERRA, J. L.; NASCIMENTO, A. R.; SILVA, W. A. S.; OLIVEIRA, M. B.; OLIVEIRA, F. C. C.; MARTINS, A. C. C. Atividade antibacteriana em meis de abelhas comercializados nos municípios do Maranhão. **XLVII Congresso Brasileiro de Química**. Recursos Renováveis. 2007.

SHEHU, A.; ISMAIL, S; ROHIN, M. A. K.; HARUN, A.; AZIZ, A. A.; HAQUE, M. Antifungal Properties of Malaysian Tualang Honey and Stingless Bee Propolis against

Candida albicans and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** Vol. 6 (02), p. 044-050. 2016.

SHERLOCK, O.; DOLAN, A.; ATHMAN, R.; POWER, A.; GETHIN, G.; COWMAN, S.; HUMPHREYS, H. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2010, 10:47.

SILVA, R.A.D.A.; MAIA, G.A; SOUSA, P.H.M. de; COSTA, J. M. C. da. **Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha**. Alimento e Nutrição. v.17, n.1, p.113-120, 2006.

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

SIMON, A.; TRAYNOR, K.; SANTOS, K.; BLASER, G., BODE, U. MOLAN, P. Medical Honey for Wound Care—Still the ‘Latest Resort’?. **eCAM** 2009;6(2)165–173.

SOUSA, J. M. B. DE; SOUZA, E. L. DE; MARQUES, G.; BENASSI, M. DE T.; GULLÓN, B.; PINTADO, M. M.; MAGNANI, M. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT - Food Science and Technology**, n.65, (2016), p. 645 e 651.

SOUZA, B., ROUBIK, D., BARTH, O., HEARD, T., ENRÍQUEZ, E., CARVALHO, C., et al. (2006). Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciência**, 31, p. 867 e 875.

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

STRAMM, Klaus Martin. **Composição e qualidade de méis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*), efeitos de estocagem e comparação com méis de *Apis mellifera***. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos:área de bromatologia). São Paulo. 2011.

SUNTIPARAPOP, K.; PRAPAIPONG, P.; CHANTAWANNAKUL, P. (2012) Chemical and biological properties of honey from Thai stingless bee (*Tetragonula leaviceps*), **Journal of Apicultural Research**, 51:1, 45-52.

TEMARU, E.; SHIMURA, S.; AMANO, K.; KARASAWA, T. Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera: Apidae; Meliponinae). **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, p. 281-285, 2007.

TORRES, A.; GARADEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of “angelita” honey - a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia. **Thermochemica Acta**, v. 415, p. 107-113, 2004.

TOSI, E. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. **Food Chemistry**, London, v. 77, p. 71-74, 2004.

USMAN, Y.; ABDULLAHI, I. N.; AHMED, N. In-vitro antimicrobial activities of crude and diluted Nigerian honey against some bacteria isolated from infected wound. **New York Science Journal**. v.8, n.7. 2015

VENTURINI, K.S.; SARCINELLI, M.F. SILVA, L.C. **Características do mel. Vitória: UFES**, 2007. p 1-8 (Boletim técnico).

VIEIRA, A. C.; DELONZEK, E. C.; LÜDKE, M. V.; BREYER, D.; LORSCHIEDER, C. A. Caracterização físico-química de mel de diferentes floradas produzido por apicultores orgânicos da região centro-sul e sudeste no estado do Paraná. **Acta Iguazu, Cascavel**, v.3, n.3, p. 138-148, 2014.

VILLAS-BÔAS, JERÔNIMO. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão. Brasília** – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). Brasil, 2012. 96 p.; il. - (Série Manual Tecnológico).

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