



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GRUPO DE ENGENHARIA DE PROCESSOS

KAREN LINELLE DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ESTUDO
DE VIDA DE PRATELEIRA EM MEL DE *Melipona mondury* DO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO**

CAMPINAS

2017

KAREN LINELLE DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ESTUDO
DE VIDA DE PRATELEIRA EM MEL DE *Melipona mondury* DO ESTADO DO
ESPÍRITO SANTO**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos*

Aluna: Karen Linelle de Oliveira

Orientadora: Dra. Maria Isabel Berto

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Karen Linelle de Oliveira e orientada pela Prof^a Dra. Maria Isabel Berto.

CAMPINAS

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Adriana Gomes do Nascimento CRB/8 8853 –
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

O48c Oliveira, Karen Linelle. Aplicação de Métodos de Conservação e Avaliação do Estudo de Vida de Prateleira em Mel de *Melipona mondury* do Estado do Espírito Santo. Karen Linelle de Oliveira / Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2017.

151 f.

Maria Isabel Berto (orientadora)

Inclui bibliografia

1. Mel de abelhas sem ferrão. 2. Propriedades físico-químicas. 3. Atividade de água. 4. Métodos conservação. 5. Pasteurização. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos, GEPC – Grupo de Engenharia de Processos. II. Karen Linelle de Oliveira. III. Título.

Título em inglês: Application of preservation methods and study on shelf life of *Melipona mondury* honey from state of Espírito Santo

Key-words: stingless bee honey, physicochemical properties, water activity, preservation methods, pasteurization

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Maria Isabel Berto, Michele Nehemy Berteli, Ricardo Costa Rodrigues de Camargo

Data da Defesa: 16 de fevereiro de 2017

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Karen Linelle de Oliveira, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de fevereiro de 2017.



Prof.ª Dra. Maria Isabel Berto
GEPC-ITAL (Presidente)



Dr. Ricardo Costa Rodrigues de Camargo
EMBRAPA MEIO AMBIENTE – EMBRAPA (titular)



Dra. Michele Nehemy Berteli
GEPC-ITAL (titular)



Prof.ª Dra. Beatriz Thie Iamanaka
CCQA-ITAL (suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, meu coração é só gratidão e alegria por mais esse desafio. Esse triunfo não é apenas meu, mas antes, ele é Teu, pois acredito que sem a fé e sem Tua ajuda jamais seria possível.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Dalva, agradeço pelos ensinamentos e incentivos para não desistir nunca; tentar encontrar as palavras necessárias para expressar todo o sentimento de gratidão e admiração por tudo o que vocês já fizeram por mim é humanamente impossível.

A Tiago Caires, meu futuro esposo, por seu constante apoio, ajuda e paciência com que acompanhou todas as etapas deste trabalho, por dividir comigo os momentos de alegrias e dificuldades, pelo amor que compartilhamos!

À professora e orientadora Dra. Maria Isabel Berto, por ser um exemplo de dedicação à pesquisa científica, pela sua confiança e amizade.

À minha banca de qualificação: Dr. Pesquisador Ricardo Camargo, Dra. Michele Berteli e Dra. Beatriz Thie pelas importantes contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores/pesquisadores do Mestrado, pelos valiosos ensinamentos repassados.

Agradecimentos especiais à Daniel Atala, Millena Dias, Bruna Dias e aos amigos da 1º turma de Mestrado pelo conhecimento compartilhado ao longo desta trajetória.

À Jerônimo Villas-Bôas pelo fornecimento do mel utilizado no projeto e informações fornecidas, contribuindo com a continuidade de pesquisas na Meliponicultura; ao Núcleo de Sustentabilidade da Fibria Celulose S.A pelo financiamento das análises microbiológicas; ao Cereal Chocotec pela parceria nas análises de atividade de água e ao CTBE pela parceria firmada na execução das análises cromatográficas.

Ao ITAL, que permitiu minha formação acadêmica pela primeira turma de Pós Graduação do Instituto aos seus 52 anos de existência, motivo de muito orgulho.

“Todos esses nossos esforços seriam em vão se não fizéssemos tudo isto por amor,
por que só o amor constrói e vence todas as barreiras”
(Apóstolo Paulo em sua 1ª carta aos Coríntios)

RESUMO

O mel de abelhas sem ferrão apresenta um perfil sensorial diferenciado especialmente pelo seu sabor ácido e elevado teor de umidade. Esse parâmetro, por sua vez, favorece o desenvolvimento de leveduras osmofílicas que afetam o tempo de vida útil do mel. Para prolongar a vida de prateleira, alguns métodos de conservação são empregados pelos meliponicultores, como a desidratação, maturação, pasteurização e refrigeração.

Este estudo consistiu na avaliação da influência da pasteurização e refrigeração em mel de *Melipona mondury* nos parâmetros físico-químicos ao longo de um ano de armazenamento.

Um lote de mel foi dividido igualmente e submetido a quatro condições distintas (T01, T02, T03 e T04). Dois sublotos foram pasteurizados, sendo um deles armazenado a temperatura ambiente (T01) e o outro mantido sob-refrigeração (T02). Os demais sublotos não foram pasteurizados, sendo um deles mantido a temperatura ambiente (T03) e outro, refrigerado (T04). Amostras dos quatro sublotos foram acompanhadas por análises físico-químicas e microbiológicas pelo período de um ano.

Nas amostras T01 e T02 a pasteurização aplicada objetivou a eliminação de micro-organismos deteriorantes não formadores de esporos, sendo as leveduras osmofílicas, escolhidas como alvos do processo. O procedimento realizado incluiu testes de distribuição de temperatura para verificar a existência de uma região de aquecimento mais lento no tanque de pasteurização e testes de penetração de calor nas embalagens de mel para o cálculo da letalidade dos micro-organismos alvos.

Todas as amostras foram avaliadas através de análises microbiológicas de *Salmonella spp.*, coliformes termotolerantes (realizadas nos tempos inicial, após 180 e 360 dias de armazenamento), contagem total de aeróbios mesófilos, contagem de bolores, leveduras e leveduras osmofílicas (periodicidade mensal) e análises físico-químicas de pH, atividade de água, umidade, acidez livre, sólidos solúveis, ácidos acético e láctico, frutose, glicose, sacarose e etanol (periodicidade mensal).

Os valores de letalidade calculados pelo histórico de temperatura do produto confirmaram que a pasteurização realizada nas amostras dos sublotos T01 e T02 foi efetiva quanto ao número de reduções decimais dos micro-organismos deteriorantes alvos do mel, as leveduras osmofílicas *Zygosacharomyces bailli* e *Z. rouxii*.

Ao longo de um ano de avaliação, as amostras T01 à T04 apresentaram valores de atividade de água que variaram de 0,703 a 0,757; o teor de umidade variou de 28 a 32,3%; os resultados de pH variaram 3,66 a 4,23; as análises de acidez livre apresentaram variação de 14,09 a 40,47 mEq/kg e o teor de sólidos solúveis mostraram variação de 67,67 a 72%. Somente nas amostras de mel referentes ao teste T03 foi detectada a presença de etanol. Em todas as análises realizadas não foram detectados *Salmonella spp.* e coliformes termotolerantes, enquanto que nos testes T03 e T04 foram observados o desenvolvimento de leveduras osmofílicas, bolores e leveduras.

Devido às características físico-químicas diferenciadas deste mel, quando comparado ao mel de *Apis mellifera* e aos resultados apresentados durante a avaliação de vida de prateleira dos testes realizados, salienta-se a necessidade da definição de parâmetros de identidade e qualidade específicos para o mel de abelhas sem ferrão que atenda suas particularidades, fornecendo subsídios para sua comercialização.

Palavras-chave: Mel de abelhas sem ferrão, propriedades físico-químicas, atividade de água, métodos de conservação, pasteurização.

ABSTRACT

Stingless bee honey showed a particular sensorial profile specially for its acid taste and high moisture content. These parameter favoring growth of osmophilic yeasts, affecting honey shelf life. Some preservation methods are used by meliponicultors to extend shelf life, such as dehydration, maturation, pasteurization and refrigeration.

This study aimed to assess the evaluation of pasteurization and refrigeration influences on *Melipona mondury* honey in the physical-chemical parameters during a year of storage.

A honey batch was equally divided and processed to four different conditions (T01, T02, T03 and T04). Two sublots were pasteurized and kept at room temperature (T01) and the other kept under refrigeration (T02). The other unpasteurized sublots, one of them was kept at room temperature (T03) and another refrigerated (T04). Samples of the four sublots were accompanied by physical-chemical and microbiological analyzes for a period of one year.

Pasteurization applied on T01 and T02 samples was aimed the elimination of non-spore-forming spoilage microorganisms, with osmotic yeasts in target process. The procedure performed included the temperature distribution tests to determine the existence of a slower heating region in the pasteurizing tank and heat penetration tests on honey flask for calculating the lethality of the target microorganisms.

Honey samples was evaluated thought microbiological analyzes of *Salmonella spp.*, thermotolerant coliforms (at initial times, after 180 and 360 days of storage), count of aerobic mesophilic bacteria, yeast and mold count and osmophilic yeasts (monthly periodicity) and physical-chemical analyzes of pH, water activity, moisture content, free acidity, soluble solids content, acetic and lactic acids, fructose, glucose, sucrose and ethanol (monthly periodicity).

Lethality values calculated from the temperatures measured by thermocouples in each flask confirmed that pasteurization were performed on T01 and T02 sublots was effective resulting in decimal reductions of spoilage target microorganism, the osmophilic yeasts *Zygosacharomyces bailli* and *Z. rouxii*.

Physicochemical analyzes showed water activity ranges from 0,703 to 0,757; moisture content results varied between 28 to 32,3%; pH values ranged 3,66 to

4,23; free acidity values ranged from 14,09 to 40,47 mEq/kg and soluble solids content varied between 67,67 to 72%. Samples of treatment T03 showed ethanol during the storage. *Salmonella spp.* and thermotolerants coliforms were not detected on treatments T01 to T04, while treatments T03 and T04 favoring growth of osmophilic yeasts, molds and yeasts.

Due to physicochemical characteristics of this honey when compared to *Apis mellifera* and the results obtained during shelf life evaluation, it is necessary to define specific quality parameters for stingless bee honey attending its particularities, providing subsidies for its legalization.

Key words: *stingless bee honey, physicochemical properties, water activity, preservation methods, pasteurization*

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	4
	2.1 Objetivo geral	4
	2.2 Objetivos específicos.....	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
	3.1 Meliponicultura	5
	3.2 Parâmetros de identidade e padrão de mel de abelhas sem ferrão	6
	3.2.1 Umidade.....	9
	3.2.2 Atividade de água (A_w)	10
	3.2.3 pH	11
	3.2.4 Acidez livre (mEq/kg)	11
	3.2.5 Hidroximetilfurfural (HMF)	12
	3.2.6 Açúcares redutores	13
	3.2.6.1 Açúcares redutores totais (ART).....	14
	3.2.7 Sacarose	15
	3.2.8 Teor de cinzas.....	15
	3.2.9 Condutividade elétrica.....	16
	3.2.10 Atividade diastásica	16
	3.3 Micro-organismos associados ao mel de abelhas sem ferrão	17
	3.3.1 Bactérias	18
	3.3.2 Bolores e leveduras	19
	3.4 Tecnologias de processamento para conservação de mel de abelhas sem ferrão	23
	3.4.1 Processamento pela remoção de água: Desidratação.....	24
	3.4.2 Processo fermentativo: Maturação.....	25
	3.4.3 Processamento pela aplicação de calor: Pasteurização	26
	3.4.3.1 Valor P: Cálculo da Intensidade do Processo Térmico	29
	3.4.4 Condição de armazenamento: Resfriamento	32
	3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	33
	3.5.1 Colunas	34
	3.5.2 Detectores.....	36
	3.6 Embalagem para acondicionamento de mel	37

4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Materiais	38
4.1.1	Matéria-prima: Mel de abelhas sem ferrão	38
4.1.2	Equipamentos para processamento	38
4.1.3	Análise estatística.....	39
4.2	Métodos	40
4.2.1	Metodologias de análises físico-químicas e microbiológicas.....	40
4.2.1.1	Determinação de acidez livre (meq/kg)	42
4.2.1.2	Determinação de umidade (%).....	42
4.2.1.3	Determinação de sólidos solúveis (%)	42
4.2.1.4	Determinação de pH	43
4.2.1.5	Determinação de atividade de água (a_w).....	43
4.2.1.6	Determinação densidade relativa e absoluta	43
4.2.1.7	Determinação de ácidos, açúcares e etanol por HPLC.....	44
4.2.1.8	Determinação de hidroximetilfurfural (HMF).....	45
4.2.1.9	<i>Salmonella</i> spp.....	46
4.2.1.10	Coliformes termotolerantes	47
4.2.1.11	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)	48
4.2.1.12	Contagem de bolores e leveduras (UFC/g).....	49
4.2.1.13	Contagem de leveduras osmofílicas (UFC/g).....	49
4.2.2	Avaliação preliminar ao processo de pasteurização.....	50
4.2.2.1	Ensaio 1 realizado no tanque de pasteurização.....	51
4.2.2.2	Ensaio 2: conduzido no banho termostático.....	53
4.2.3	Tecnologias de conservação: metodologias aplicadas ao mel de <i>M. mondury</i>	55
4.2.3.1	Processo de pasteurização	55
4.2.3.1.1	Critérios utilizados no Processo de Pasteurização	58
4.2.3.2	Condições de armazenamento: Refrigeração e Temperatura ambiente	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1	Avaliação preliminar ao processo de pasteurização	61
5.1.1	Ensaio 1.....	61
5.1.2	Ensaio 2.....	64

5.2	Avaliação dos processamentos aplicados.....	65
5.2.1	Condições de armazenamento: Refrigeração e Temperatura ambiente	65
5.2.2	Processo de pasteurização.....	66
5.3	Caracterização físico-química dos méis durante a estocagem	69
5.3.1	Relação entre pH e atividade de água (a_w).....	84
5.3.2	Análises de açúcares, ácidos e etanol durante estocagem	85
5.4	Características microbiológicas dos méis durante a estocagem	96
6	CONCLUSÕES.....	101
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	103
8	REFERÊNCIAS	104
9	APÊNDICE.....	121
10	ANEXOS.....	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de identidade e qualidade vigentes pelas legislações brasileira, Mercosul e Codex para mel de <i>A. mellifera</i>	7
Tabela 2. Principais parâmetros físico-químicos de méis de abelha sem ferrão pesquisados na literatura.....	8
Tabela 3. Binômios de tempo e temperatura relatados na literatura para méis de abelha provenientes de <i>A. mellifera</i> e abelha sem ferrão (ASF).....	28
Tabela 4. Resistência térmica e valores de atividade de água (a_w) e pH de micro-organismos.	32
Tabela 5. Cronograma de análises físico-químicas e microbiológicas ao longo de um ano de acompanhamento das amostras.....	41
Tabela 6. Relação de termopares distribuídos no tanque de pasteurização e nos frascos contendo mel no ensaio de distribuição de temperatura.	52
Tabela 7. Distribuição de termopares ao longo do tanque de pasteurização e nos frascos.	54
Tabela 8. Descrição dos métodos aplicados em mel de <i>M. mondury</i>	55
Tabela 9. Distribuição de termopares no tanque de pasteurização e frascos de mel.	57
Tabela 10. Referências de temperaturas de processo encontradas na literatura. ...	59
Tabela 11. Micro-organismos alvos e respectivos D e z utilizados para cálculo de P.	60
Tabela 12. Classificação das curvas de temperatura ordenadas em função da menor média durante o aquecimento.	62
Tabela 13. Classificação das curvas de temperatura ordenadas em função do menor valor P durante a etapa de aquecimento.	62
Tabela 14. Termopares de monitoramento do banho termostático.	65
Tabela 15. Classificação das curvas de temperaturas ordenadas em função do menor valor P durante a etapa de aquecimento.	65
Tabela 16. Cálculo de intensidade do tratamento térmico (P) nos frascos de méis monitorados durante a pasteurização.....	68
Tabela 17. Parâmetros físico-químicos de mel de <i>Melipona mondury</i> durante um ano de vida de prateleira, em função das análises físico-químicas realizadas.....	70

Tabela 18. Parâmetros físico químicos (valores máximos e mínimos) e médios \pm DP obtidos ao longo do armazenamento por um ano.	81
Tabela 19. Resultados das análises realizadas em HPLC durante a estocagem de amostras referentes aos testes T01 a T04.....	85
Tabela 20. Ratios frutose/glicose (F/G) obtidos nos testes T01 a T04 durante o armazenamento.	90
Tabela 21. Ratios glicose/umidade (G/U) obtidos nos testes T01 a T04 durante o armazenamento.	90
Tabela 22. Análises microbiológicas monitoradas durante 1 ano de armazenamento de amostras referentes aos testes T01 a T04.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de leveduras em função do tempo. Fonte: (ZAMORA,2009).	20
Figura 2. Esquematização simplificada de um cromatógrafo líquido. Fonte: (JARDIM et al.,2014).	34
Figura 3. Uso da coluna Aminex HPX-87H para análise de um composto de fermentação em detectores UV e índice de refração. Fonte: (BIO-RAD,2016).	36
Figura 4. Distribuição de frascos de acordo com as vistas frontal (à esquerda) e lateral (à direita) de um cesto do tanque de pasteurização utilizado no ensaio de distribuição de temperatura.	51
Figura 5. Esquematização de frascos em tanque de pasteurização no ensaio 1 de distribuição de temperatura.	52
Figura 6. Montagem de espaçadores, poços de 35 mm (à esquerda) e 40 mm (à direita).	53
Figura 7. Instrumentação de tampas com poços para introdução de termopar (à esquerda) e frascos com poços de 40 mm e 35 mm.	53
Figura 8. Posicionamento dos frascos no banho (vista superior).	54
Figura 9. Frascos de vidro com mel de <i>M. mondury</i>	55
Figura 10. Distribuição de termopares no tanque de pasteurização no ensaio de penetração de calor.	57
Figura 11. Instrumentação dos frascos para a aquisição das temperaturas (cesto 1, à esquerda e cesto 2, à direita).	58
Figura 12. Instrumentação do tanque de pasteurização.	58
Figura 13. Históricos de temperatura obtidos durante o ensaio de distribuição de temperatura.	61
Figura 14. Históricos de temperatura obtidos durante o segundo ensaio de distribuição de temperatura.	64
Figura 15. Históricos de temperatura obtidos durante o ensaio de penetração de calor em méis testes T01 e T02. Valores de P calculados em função do <i>Z. rouxii</i> . ..	67
Figura 16. Análises estatísticas realizadas nos testes T01 a T04 para a_w durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).	72
Figura 17. Análises estatísticas realizadas nos testes T01 a T04 para umidade durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).	74

Figura 18. Análises estatísticas realizadas nos testes T01 a T04 para pH durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).	76
Figura 19. Análises estatísticas realizadas nos testes T01 a T04 para acidez durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).	78
Figura 20. Análises estatísticas: testes T01 a T04 para sólidos solúveis durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).	80
Figura 21. Parâmetros físico-químicos de atividade de água, pH e acidez médios ao longo de um ano de acompanhamento. Fonte: (STATSOFT,2016).	82
Figura 22. Parâmetros físico-químicos de umidade e sólidos solúveis médios ao longo de um ano de acompanhamento.	83
Figura 23. Relação entre pH e atividade de água, considerando os valores médios obtidos de cada teste.	84
Figura 24. Concentração de ácido acético presente nos testes T01 a T04 durante o tempo de armazenamento por um ano.	87
Figura 25. Concentração de ácido láctico presente nas amostras de mel nos testes T01 a T04 ao longo de um ano de estocagem.	87
Figura 26. Concentração de glicose nas amostras de mel dos testes T01 a T04 ao longo do tempo de estocagem.	89
Figura 27. Concentração de frutose nas amostras de mel nos testes T01 a T04 durante um ano de acompanhamento.	89
Figura 28. Presença de cristalização nos de frascos de méis dos testes T04 após 60 e 365 dias de armazenamento.	91
Figura 29. Teor de açúcares redutores totais (ART) presente nas amostras de méis nos testes T01 a T04 durante 1 ano.	92
Figura 30. Concentração de sacarose nas amostras de mel presente nos testes T01 a T41 durante um ano de acompanhamento.	93
Figura 31. Teor de hidroximetilfurfural (mg/kg) em relação ao tempo de estocagem do mel dos testes T01 , T02, T03 e T04.	94
Figura 32. Teor de etanol (g/100 g) presente somente nos méis do teste T03.	95

1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão (ASF) são insetos sociais encontrados, em sua maioria, nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que, na região Neotropical, a qual compreende a América Central, parte do México, ilhas do Caribe e América do Sul, 417 espécies foram catalogadas (CHUTTONG et al.,2016;PEDRO,2014).

São conhecidas também como abelhas nativas ou indígenas, as quais possuem o ferrão atrofiado. Pertencem à ordem Hymenoptera, classificada na família Apidae, a qual se divide em quatro tribos, sendo duas de maior destaque: Meliponini e Trigonini (CHUTTONG et al.,2016).

O manejo de abelhas sem ferrão é relacionada à meliponicultura, enquanto que a apicultura, amplamente difundida mundialmente, é voltada ao manejo de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) (OLIVEIRA et al.,2012).

No Brasil existe um grande potencial exploratório para a produção de mel de abelhas sem ferrão. Além da importância econômica para os produtores, fatores como a valorização do mel na gastronomia e a busca por sabores exóticos, tornaram um produto com alto valor agregado (HOLANDA et al.,2012).

Em função de suas características distintas, o mel de abelhas sem ferrão não possui uma legislação própria. De acordo com as regulamentações internacionais, são contemplados somente os parâmetros de qualidade para o mel proveniente de abelhas *A. mellifera*, um produto que deve conter teor de umidade máximo de 20% (CODEX,2001) e é estável do ponto de vista microbiológico, pois apresenta atividade de água, $\leq 0,60$. O desenvolvimento de parâmetros de identidade e qualidade para o mel de abelhas sem ferrão é de suma importância para a comercialização adequada do produto, detecção de possíveis adulterações e a manutenção das boas práticas para manipulação.

Apesar da ausência de uma legislação aplicável para o mel de abelhas sem ferrão, diversos produtores aderiram à meliponicultura ao invés da apicultura e comercializam informalmente o produto, principalmente devido ao seu alto valor econômico (SILVA,PAZ,2012).

Alguns estados brasileiros tomaram iniciativas pioneiras em relação à comercialização de mel de abelhas sem ferrão. O estado da Bahia aprovou a Portaria ADAB nº207 em 21/11/2014 sobre o regulamento técnico de Identidade e Qualidade do mel de abelha do gênero *Melipona*; o estado do Amazonas publicou a

portaria ADAF Nº81 em 26/06/2015 sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha Social Sem Ferrão. Já os estados do Paraná e São Paulo estão em processo de regulamentação do mel de ASF.

O mel de ASF é composto de açúcares redutores (principalmente frutose e glicose), açúcares não redutores (sacarose e maltose), água, cinzas, assim como, aminoácidos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, vitamínicos e minerais (FUENMAYOR et al.,2013;SILVA et al.,2013a).

Entre as peculiaridades dos méis de ASF, podem ser destacados os elevados teores de acidez e umidade, esse último por sua vez, influencia diretamente nos valores de atividade de água, tornando-o mais susceptível ao desenvolvimento microbiano (CAMARGO et al.,2017;VENTURIERI et al.,2007).

As leveduras osmofílicas são o grupo de micro-organismos de maior importância em mel devido ao seu grande potencial de fermentação. São capazes de desenvolver-se em ambientes com elevadas concentrações de açúcares, umidade e atividade de água entre 0,6 a 0,8, afetando diretamente o tempo de vida útil do mel (PITT,HOCKING,2009).

Alguns métodos de conservação podem ser empregados para prolongar a vida de prateleira do mel de abelha sem ferrão. Os meliponicultores devem escolher um beneficiamento que seja eficaz e seguro para os consumidores. Os métodos de processamento visam transformar o mel *in natura* em um produto estável, durante sua vida de prateleira (WITTER,NUNES-SILVA,2014). Entre os métodos encontrados na literatura podem ser destacados: a desidratação, maturação, refrigeração e a pasteurização. A desidratação consiste na remoção de água do mel com auxílio de um desumidificador e devido a isso, é popularmente conhecido como desumidificação (SEMKIW et al.,2010). A maturação é um processo fermentativo que ocorre naturalmente após a colheita do mel, à temperatura ambiente, (MENEZES et al.,2013). A refrigeração objetiva a redução da temperatura do produto para inibição do desenvolvimento microbiano e a pasteurização é um tratamento térmico que visa eliminar micro-organismos patogênicos e deteriorantes (FELLOWS,2006).

Em função de suas características físico-químicas diferenciadas, as legislações nacionais e internacionais vigentes não são apropriadas para o mel de

abelhas em ferrão. É necessário o desenvolvimento de regulamentações específicas para esse produto, para auxiliar a comercialização legalizada no Brasil.

Diante da importância deste cenário, esse projeto consistiu em avaliar a influência da pasteurização e refrigeração em amostras de mel de *Melipona mondury* através do acompanhamento de parâmetros físico-químicos e microbiológicos durante o período de um ano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo baseia-se na avaliação da influência dos processos de pasteurização em mel de *Melipona mondury* armazenado em temperatura ambiente e sob-refrigeração e o estudo da vida de prateleira durante o período de um ano, através de análises físico-químicas e microbiológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Definição dos micro-organismos alvos do processo térmico do mel de *M. mondury* e avaliação do processo de pasteurização através de testes de distribuição de temperatura no equipamento de processo para verificar a região de aquecimento mais lento e de testes de penetração de calor no produto embalado necessário para o cálculo de letalidade do processo térmico;
- Caracterização e estudo da vida de prateleira do mel de *M. mondury* através de parâmetros físico-químicos de atividade de água (a_w), pH, umidade, sólidos solúveis, acidez livre, hidroximetilfurfural (HMF), determinação dos teores de etanol, açúcares e ácidos acético, láctico e microbiológicos: *Salmonella ssp*, coliformes termotolerantes, contagem total de aeróbios mesófilos, contagem de bolores e leveduras, contagem de leveduras osmofílicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Meliponicultura

O manejo de abelhas nativas sem ferrão (meliponíneos) é denominada meliponicultura, difundida em países tropicais e subtropicais das Américas Central e do Sul, África e Oceania, tendo como principal objetivo a produção de mel (MICHENER,2013).

Taxonomicamente, as abelhas sem ferrão são classificadas na família Apidae, inseridas na superfamília Apoidea, a qual possui 4 subfamílias: Apinae, Bombinae, Euglossinae, Meliponinae. Esta última pode ser dividida em três tribos, sendo duas de maior destaque: Meliponini e Trigonini (BUENO,2010).

A principal diferença entre ambas as tribos está na formação de rainhas. Nas espécies pertencentes à tribo Meliponini não há construção de células reais, todas as células de cria são iguais, enquanto que as abelhas da tribo Trigonini constroem células reais, de tamanho maior do que as células comuns. Em função desse tamanho, as larvas que se desenvolvem nesta célula recebem quantidade maior de alimento, determinando a formação de uma nova rainha virgem (SOARES,2012;VILLAS-BÔAS,2012).

São abelhas nativas do território brasileiro, comumente conhecidas como “abelhas sociais sem ferrão”, “indígenas” e/ou “nativas sem ferrão”; pertencem a um grupo que não possuem glândulas de veneno, sendo seu ferrão atrofiado, o qual não é possível utilizá-lo como mecanismo de defesa (VÉRAS,2012). São abelhas dóceis que caracterizam um manejo mais facilitado, principal vantagem em relação à apicultura (OLIVEIRA et al.,2012).

Os meliponíneos geralmente constroem seus ninhos em ocos de árvores vivas, apresentam entradas típicas que podem ser construídos de barro, cera ou cerume (uma mistura de cera e resina vegetal), produzidos pelas próprias abelhas (AIDAR,1996;MICHENER,2013;VENTURIERI et al.,2007).

Dentro de cada ninho o alimento é armazenado em estruturas chamadas “potes” e na parte central ficam localizados os favos de cria, onde a rainha deposita os ovos em células individuais. As abelhas retiram o néctar da flor, o qual é processado por enzimas de seu aparelho digestório. Quando chegam à colmeia elas regurgitam nos potes, onde perderá parte da água, transformando-se em mel (MICHENER,2013).

O mel é armazenado em potes feitos de cerume (composto de cera e resinas), os quais auxiliam na conservação, influenciam na cor e sabor dos méis (ROUBIK,2006).

O mel produzido pelos meliponíneos é caracterizado por uma composição complexa de açúcares, principalmente glicose e frutose, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, compostos fenólicos, enzimas (glicose oxidase e catalase) (GHELDOLF,ENGESETH,2002;SILVA et al.,2013a).

A composição é variável e depende principalmente da origem floral e geográfica, espécie produtora, condições climáticas, solo e armazenamento (SOUSA et al.,2016).

O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, através da Resolução nº 346, de 16 de agosto de 2004 regulamenta a utilização de abelhas nativas, bem como a implantação de meliponários (BRASIL,2004).

3.2 Parâmetros de identidade e padrão de mel de abelhas sem ferrão

De modo geral, o mel produzido pelos meliponíneos possui diferenças em algumas propriedades físico-químicas quando comparados ao mel de abelhas africanizadas, principalmente em relação à umidade e acidez.

O Brasil não possui legislação específica de produtos originários da meliponicultura. Em relação às abelhas, existem somente legislações relacionadas às abelhas africanizadas (*A. mellifera*). De acordo com as regulamentações internacionais, são contemplados, para fins de comercialização, somente os parâmetros de qualidade para o mel proveniente de abelhas *A. mellifera* (CODEX,2001). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do mel, através da Instrução Normativa nº11, de 20 de outubro de 2000, este por sua vez, baseado em normatizações internacionais. (BRASIL,2000).

Os parâmetros relacionados nestes regulamentos, presentes na Tabela 1, não são adequados para o mel de abelhas sem ferrão, e conseqüentemente, impedem sua comercialização.

Na Tabela 1 estão relacionados os principais parâmetros de qualidade estabelecidos pelas legislações brasileira, Mercosul (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) e Codex, específicos para mel de *A. mellifera*.

Tabela 1. Parâmetros de identidade e qualidade vigentes pelas legislações brasileira, Mercosul e Codex para mel de *A. mellifera*.

Parâmetros	(BRASIL,2000); (MERCOSUL,1999)	(CODEX,2001)
Açúcares redutores (% m/m)	mínimo 65,0	máximo 60,0
Umidade (%)	máximo 20,0	máximo 20,0
Sacarose aparente (%)	máximo 6,0	máximo 5,0
Cinzas (%)	máximo 0,60	*
Acidez (meq/kg)	máximo 50,0	máximo 50,0
Hidroximetilfurfural (HMF) (mg/kg)	máximo 60,0	máximo 40,0

(*): valor não estabelecido.

Diante disso, a determinação de parâmetros físico-químicos específicos para o mel de abelhas sem ferrão é necessária para estabelecer diretrizes de qualidade, referência para fiscalização e para detecção de possíveis adulterações no produto.

Na Tabela 2 estão apresentados os principais parâmetros físico-químicos encontrados na literatura sobre mel de abelhas nativas, relacionando estudos realizados no Brasil e em outros países, em diversas espécies de abelhas sem ferrão, tais como: *Melipona bicolor*, *M. capixaba*, *M. compressipes manaoense*, *M. fasciculata* Smith, *M. mandacaia smith*, *M. marginata*, *M. mondury*, *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris*, *M. scutellaris* Latrelle, *M. scutellaris*, *M. seminigra*, *M. subnitida* Ducke, *M. subnitida*, *Plebeia* sp, *Scaptotrigona depilis*, *S. bipunctata*, *S. xanthotricha*, *Tetragonisca angustula latreille*.

Tabela 2. Principais parâmetros físico-químicos de méis de abelha sem ferrão pesquisados na literatura.

Referência	Umidade (%)	pH	Atividade de água (a_w)	Acidez livre (mEq/kg)	HMF (mg/kg)	Açúcares redutores (%)	Glicose g/100 g	Frutose g/100 g	Sacarose g/100 g
(ALMEIDA-MURADIAN,MATSUDA,2007)	24,80-30,60	3,41-4,06	0,74-0,76	20,63-27,82	**	**	28,59-29,8	30,72-31,73	0,16-0,21
(ALMEIDA-MURADIAN et al.,2013)	23,86-25,88	**	**	31,79-33,19	7,18-8,22	**	21,76	29,21	4,86
(ALMEIDA-MURADIAN,2013)	23,40-25,60	**	**	21,65-65,85	0,30-0,93	**	**	**	**
(ALMEIDA-MURADIAN et al.,2014)	23,06-26,00	**	**	21,49-31,74	7,04-42,98	**	21,99-23,0	29,05-30,11	**
(ALVES et al.,2005)	23,14-32,50	3,16-3,54	**	18,50-62,50	0,52-16,54	64,29-82,10	**	**	0,61-6,19
(ANACLETO et al.,2009)	23,00-32,50	3,54-4,64	0,59-0,82	17,00-98,00	0,75-30,58	48,66-57,97	**	**	0,13-1,87
(CAMPOS et al.,2010)	22,05-22,72	3,71-4,46	**	37,00-85,50	**	54,85-60,12	**	**	4,43-8,89
(DUARTE et al.,2012)	28,50-31,75	3,62-5,14	**	21,74-130,24	4,40-21	66,73-73,96	**	**	1,13-3,37
(HOLANDA et al.,2012)	21,44-27,51	3,10-4,4	**	22,78-42,67	5,44-70,79	50,01-65,79	**	**	0,89-6,08
(LAGE et al.,2012)	25,84-36,04	3,17-5,67	0,59-0,77	2,07-122,50	**	**	**	**	-
(NASCIMENTO et al.,2015)	25,99-39,89	2,93-4,08	**	22,55-48,58	27,99-58,27	66,32-75,21	**	**	0,36-1,61
(SILVA,2011)	22,30-24,40	2,90-3,80	0,658-0,727	24,60-59,60	10,80-15,76				
(SILVA et al.,2013b)	22,00-24,40	2,90-3,70	0,65-0,72	24,5-93,50	10,80-15,76	50,50-72,77	**	**	**
(SOUSA et al.,2016)	23,90-28,90	3,10-5,30	**	17,88-86,85	0	**	37,7-45,4	50,0-59,20	0,7-3,0
(SOUZA et al.,2004)	26,80-32,00	3,27-4,38	**	21,50-80,50	0,52-7,93	-	**	**	**
(SOUZA et al.,2006)	24,70-29,50	3,27-3,81	**	36,60-49,70	2,40-16,00	58-68,00	**	**	1,1-4,8
(SOUZA et al.,2009)	21,00-42,10	**	0,598-0,837	**	**	**	**	**	**
(OLIVEIRA,SANTOS,2011)	24,50-25,00	3,49-4,53	**	20,23-118,14	4,20-5,80	58,14-61,35	**	**	3,24-5,54

** Análise não realizada.

Nos próximos itens são apresentadas as principais características físico-químicas do mel de abelhas sem ferrão, suas particularidades e dados encontrados na literatura para umidade, atividade de água, acidez livre, HMF e açúcares redutores. As análises de teor de cinzas, condutividade elétrica e atividade diastásica são abordadas, no entanto não foram estudadas neste projeto.

3.2.1 Umidade

A água é o segundo principal componente do mel; o teor de umidade é um dos parâmetros mais importantes, capaz de influenciar diretamente na viscosidade, maturação, cristalização, sabor e principalmente, em sua conservação (BIJLSMA et al.,2006;NASCIMENTO et al.,2015). É a principal característica que difere o mel de abelhas nativas e o mel de *A. mellifera*.

O elevado teor de água encontrado em méis de abelha sem ferrão é devido à baixa taxa de desidratação do néctar durante o processo de transformação em mel (OLIVEIRA,SANTOS,2011). O teor de água também é influenciado pela umidade relativa do ar e possivelmente pela composição do pote (composto de cera e resinas), enquanto que as abelhas africanizadas, a colmeia é constituída de cera pura (NASCIMENTO et al.,2015).

Méis de espécies de habitat úmidos normalmente apresentam um conteúdo maior de água, que é influenciado pelas condições ambientais externas (ALVES et al.,2005). As chuvas e a saturação do ar pela água também podem influenciar o teor de água no mel, provocando uma “diluição” do néctar (CAMPOS et al.,2010).

Na sequência serão abordados alguns trabalhos encontrados na literatura sobre o teor de umidade em méis de abelha sem ferrão de diversas espécies.

Amostras de méis de *Tetragonula laeviceps-pagdeni*, provenientes da Tailândia apresentaram o valor médio de 24,7%±1,7 (CHUTTONG et al.,2016). Em amostras de *Melipona eburnea* analisadas na Colômbia foram encontrados resultados de 19,9 a 41,9% nos teores de umidade (CABRERA et al.,2015). No Brasil, amostras de méis de *Melipona subnitida* (jandaíra) apresentaram valores de umidade de 22,2 a 24,4% (SILVA et al.,2013a). Em um estudo sobre características físico-químicas de diferentes tipos de méis do semi-árido do Nordeste foram encontrados valores de umidade na faixa de 23,90 a 29,90% (SOUSA et al.,2016). Em amostras de méis de *Melipona subnitida*, os valores de umidade variaram de 23,06 a 26% (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2014).

3.2.2 Atividade de água (A_w)

A atividade de água é definida como a razão da pressão de vapor de água no alimento e a pressão de vapor saturado da água na mesma temperatura, de acordo com a Equação 1 (FELLOWS,2006).

$$a_w = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

Sendo:

P (Pa) = pressão de vapor do alimento;

P_0 (Pa) = pressão de vapor da água pura na mesma temperatura.

A determinação da atividade de água é um parâmetro que define a disponibilidade de água em um alimento e um dos principais fatores que controla o crescimento microbiano (KORNACKI,2014;ZAMORA et al.,2006). Apesar de sua importância, não é uma análise que consta na legislação de mel de abelhas africanizadas em vigor (BRASIL,2000). Entretanto, é um fator fundamental em conjunto com o valor de pH para a determinação de um método de conservação de um produto alimentício.

O comportamento dos micro-organismos em função da atividade de água mínima e ótima são variáveis. De acordo com a literatura, produtos com atividade de água abaixo de 0,60 apresentam estabilidade microbiológica (BARBOSA-CÁNOVAS et al.,2007).

A atividade de água que favorece o crescimento de bactérias compreende valores acima de 0,90, exceto *Staphylococcus aureus*, o qual pode se desenvolver em $a_w=0,85$ e as bactérias halofílicas, com a_w mínimo de 0,75 (FELLOWS,2006). Entretanto, o grupo que compreende fungos e leveduras pode multiplicar-se em a_w de até 0,80. No caso de leveduras osmofílicas, a atividade ótima relatada é de 0,61 a 0,65 (BARBOSA-CÁNOVAS et al.,2007;LANDGRAF,2004).

Apesar da relevância desta análise, ainda são poucos trabalhos relatados na literatura a respeito do tema. No Brasil, amostras de méis de *Melipona subnitida* provenientes do município de Vieirópolis-PB apresentaram valores de 0,65 a 0,72 (SILVA et al.,2013b). Valores de atividade de água foram analisados em méis de espécies distintas, como *Melipona capixaba* (0,69-0,77), *Melipona rufiventris* (0,59-0,65) e *Melipona mondury* (0,69-0,79) provenientes de diversas regiões do Brasil (LAGE et al.,2012).

3.2.3 pH

O pH é a medida da concentração de íons hidrogênio (H^+) de um alimento, é representado pela Equação 2. Quanto menor é o valor de pH, maior a concentração de H^+ . É um parâmetro importante na limitação do desenvolvimento microbiano em um alimento (FELLOWS,2006).

$$pH = \frac{\log 1}{[H^+]} \quad (2)$$

Assim como a análise de atividade de água, o pH não é um requisito obrigatório para o atendimento da legislação do mel proveniente de *A. mellifera*. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, o pH em conjunto com a a_w são parâmetros necessários para a classificação do alimento em função da escolha de um método de conservação efetivo.

O pH pode ser influenciado pelo néctar, composição do solo e pelas diferentes concentrações de minerais como cálcio, potássio e sódio. Substâncias mandibulares da abelha acrescidas ao néctar do transporte até a colmeia também podem alterar o seu pH (DARDÓN et al.,2013).

O pH ácido inibe a presença e o desenvolvimento de micro-organismos, é um parâmetro de grande importância durante a coleta e armazenamento do mel devido à influência na estabilidade, tempo de vida de prateleira e textura (SILVA et al.,2013b).

Na sequência serão abordados alguns trabalhos encontrados na literatura em relação ao pH em méis de abelha sem ferrão de diversas espécies.

Foram analisadas amostras de méis produzidos por *Melipona fasciculata* Smith da região do cerrado maranhense e foram reportados valores de pH de 3,1 a $4,4 \pm 0,4$ (HOLANDA et al.,2012). Valores de pH de 3,1 a 5,3 foram encontrados em méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão na região semi-árida brasileira (SOUSA et al.,2016). Em méis de *Melipona scutellaris*, *M. quadrifasciata*, *M. subnitida* e *Plebeia sp*, provenientes do estado de Alagoas, Brasil, foram encontrados valores de pH que variaram de 3,62 a 5,14 (DUARTE et al.,2012).

3.2.4 Acidez livre (mEq/kg)

A ocorrência de acidez é devido a presença de ácidos orgânicos no mel de abelhas sem ferrão, principalmente ácido glucônico que estão em equilíbrio com as lactonas correspondentes e alguns íons inorgânicos como fosfatos e sulfatos

(ALMEIDA-MURADIAN et al.,2013). A acidez do mel é determinada pela presença de ácido glicônico e de sua lactona.

A acidez contribui para a estabilidade do mel e no retardamento do desenvolvimento de micro-organismos. O ácido glucurônico é o mais comum, outros ácidos formados em menores quantidades incluem: acético, benzóico, butírico, cítrico, fórmico, láctico, propiônico, succínico e valérico (DARDÓN et al.,2013).

A análise de acidez livre não está diretamente relacionada ao pH devido a ação tampão promovida por variados ácidos e minerais presentes no mel. É um parâmetro de grande importância durante a extração e armazenamento desse produto devido a sua influência na textura, estabilidade e vida de prateleira (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2013).

Alguns trabalhos estão descritos a seguir em relação aos teores de acidez livre encontrados em espécies distintas de abelhas sem ferrão.

Em amostras de *Melipona subnitida* obtidas do estado da Paraíba, Brasil, foram encontrados valores de 24,66 a 59,66 meq/kg de acidez livre (SILVA et al.,2013b). No estudo de amostras de méis de *Melipona scutellaris*, *M. quadrifasciata* e *M. subnitida* provenientes do estado de Alagoas, Brasil, foram obtidos valores de acidez de 21,74 a 51,94 meq/kg (DUARTE et al.,2012).

3.2.5 Hidroximetilfurfural (HMF)

O hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furaldeído ou HMF) consiste de um aldeído cíclico que se origina principalmente da desidratação da frutose em meio ácido, processo que está relacionado ao grau de envelhecimento do mel ou processamento que envolva aumento de temperatura (CAPUANO,FOGLIANO,2011;CRANE,1983;TOSI et al.,2002).

O HMF também pode ser formado em temperaturas baixas durante longos períodos de armazenamento, mas em baixas concentrações, uma vez que a reação de Maillard diminui nessas condições. Além da temperatura, a formação de HMF depende da composição do mel, como o tipo de açúcar, pH, a_w (BILUCA et al.,2014). Por estas razões o HMF é amplamente conhecido como um parâmetro de frescor no mel pois ele é ausente em méis frescos e tende a aumentar durante o processamento ou envelhecimento do produto (SOUSA et al.,2016).

A velocidade da reação de Maillard também é função da atividade de água, atingindo seu máximo em valores de a_w de 0,6 a 0,7. A reação de Maillard pode ser

controlada pela atividade de água e conseqüentemente a formação de HMF diminui. Quando a acidez é elevada, a reação de Maillard diminui e a formação de HMF é inibida (FENNEMA et al.,2010).

Em relação ao teor de açúcares, quando o teor de glicose é elevado, a velocidade da reação de Maillard ocorre em maior intensidade, refletindo na formação de HMF. Em mel de abelhas sem ferrão, o açúcar predominante é a frutose (BILUCA et al.,2014).

Diversos fatores estão relacionados sobre a influência dos teores de HMF como a temperatura e tempo de tratamento térmico, condições de estocagem e pH (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2013). Assim sendo, a presença de HMF é considerado um reflexo do armazenamento em locais impróprios a longo prazo. Além disso, as condições de tempo e temperatura durante o amadurecimento e manutenção do mel na colmeia também influenciam para a sua formação (CHUTTONG et al.,2015).

Na sequência alguns trabalhos encontrados na literatura estão descritos em relação aos teores de HMF em méis de abelhas sem ferrão.

Em amostras de méis de meliponíneos, provenientes do Paraná, coletados e armazenados à 8°C, as análises de HMF foram realizadas em um período que não excedeu 30 dias. Foram encontrados valores de HMF de 29,50 a 58,27 mg/kg (NASCIMENTO et al.,2015).

Méis de jandaíra (*Melipona subnitida*) da região nordeste do Brasil foram coletados, refrigerados à 8°C e analisados após 6 meses. Foram obtidos os valores de HMF de 10,80 a 15,76 mg/kg (SILVA et al.,2013b).

Amostras de méis de cinco diferentes espécies de abelha sem ferrão do estado do Alagoas, Brasil foram coletados de meliponários e posteriormente analisados quanto ao teor de HMF. Foram obtidos valores de 4,40 a 21 mg/kg (DUARTE et al.,2012).

3.2.6 Açúcares redutores

Os monossacarídeos glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem grupo carboxílico e cetônico livres, capazes de oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas (SILVA et al.,2003).

Os principais açúcares encontrados em méis de abelhas nativas são a glicose e frutose em proporções próximas. Geralmente a frutose é predominante,

responsável pela doçura do mel e alta higroscopicidade. Méis com altos teores de frutose podem permanecer líquidos durante longos períodos sem cristalizar (SILVA et al.,2003).

A glicose é um dos componentes responsáveis pela cristalização no mel, esta tendência pode ser estimada pela relação de glicose/água (G/A). Nesta reação, ocorre a precipitação de glicose, aumentando o teor de umidade da fase líquida do mel. A glicose também pode favorecer a acidez, a ação da enzima glicose-oxidase, formando ácido glucônico, responsável por 70% a 90% dos ácidos orgânicos presentes no mel (SILVA,2011).

A tendência de cristalização no mel está diretamente relacionada com alguns parâmetros muito sensíveis a este fator, tais como os ratios; que é a tradução do inglês para “relação”, ou seja, é a relação entre frutose/glicose e glicose/teor de umidade (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2014).

Para a análise de açúcares redutores e açúcares redutores totais em alimentos, existem diversos métodos não seletivos que apresentam resultados com bom grau de confiabilidade, após exclusão de interferentes. Outros métodos mais seletivos são estudados e aplicados como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que identifica uma maior variedade de açúcares na amostra, por ser mais sensível e apresentar menor tempo de análise (SILVA et al.,2003).

3.2.6.1 Açúcares redutores totais (ART)

É um indicador que representa a quantidade total de açúcares do mel (sacarose, glicose e frutose). O ART é determinado pela relação de estequiometria das reações e dos pesos moleculares dos compostos envolvidos, determinando assim o rendimento teórico de 1,05% na conversão da sacarose por peso em glicose, conforme a reação: $C_{12}H_{22}O_{11} \rightarrow 6 C_6H_{12}O_6$. É um índice muito utilizado em processos fermentativos. Em cana de açúcar, por exemplo, estudos mostram que nas primeiras 14 horas de deterioração da cana, 93% das perdas de sacarose ocorrem devido à ação de micro-organismos, 5,7% decorrente de reações enzimáticas e 1,3% por reações químicas, resultantes da acidez (RIPOLI,RIPOLI,2004).

3.2.7 Sacarose

A sacarose é um dissacarídeo não redutor, passível de hidrólise através dos ácidos diluídos ou enzimas (invertase), resultando em frutose e glicose (FENNEMA et al.,2010).

Teores elevados de sacarose indicam méis adulterados ou colhidos prematuramente (MOREIRA,DE MARIA,2001).

Em méis de abelhas sem ferrão o teor de sacarose é variado e depende da espécie e da flora que o originou (VENTURIERI et al.,2007).

Na literatura são reportados baixos valores de sacarose, conforme trabalhos relatados na sequência.

No estudo de amostras de méis de diversas espécies de meliponíneos do estado do Paraná foram reportados valores de sacarose de 0,36 a 1,61g/100g (NASCIMENTO et al.,2015).

Espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona compressipes manaoense* e *Melipona seminigra merribae*), coletadas do estado do Amazonas, Brasil, apresentaram o teor de sacarose na faixa de 0,16 a 0,21g/100g (ALMEIDA-MURADIAN,MATSUDA,2007).

Amostras de méis de *M. subnida* Duke e *Melipona scutellaris* Latrelle de uma região semi-árida do Brasil foram avaliadas em relação às análises físico-químicas. Foram encontrados valores de 0,7 a 3,0 g/100g (SOUSA et al.,2016).

3.2.8 Teor de cinzas

Sua determinação é realizada pela pesagem do resíduo após a combustão completa dos compostos orgânicos do alimento, oferece também a estimativa do total de conteúdo mineral (FENNEMA et al.,2010). As cinzas, portanto, representam diretamente o teor de resíduos inorgânicos após a carbonização do mel. A variabilidade no teor de cinzas pode ser explicada pela origem floral (MALIKA et al.,2005).

O teor de cinzas é um indicador da quantidade de mineral recolhido pela abelha durante o forrageamento (“procura por alimento”) na flora. É um parâmetro que indica o teor de minerais que são afetados por diferentes origens geográficas e possíveis contaminações do meio ambiente (SUNTIPARAPOP et al.,2012).

Alguns trabalhos encontrados na literatura são apresentados a seguir relacionando os teores de cinzas em méis de abelha sem ferrão.

Em amostras de mel de abelhas sem ferrão (*M. subnida* Duke e *M. scutellaris*) provenientes do Rio Grande do Norte e Paraíba, Brasil, foram encontrados teores de cinzas de 0,1 a 0,52 g/100 g (SOUSA et al.,2016). Teores similares (0,01 a 0,27 g/100 g) também foram encontrados em méis de jandaíra (*M. subnitida*) (SILVA et al.,2013b). Em amostras de méis de *M. subnitida* foram encontrados valores de 0,02 g/100 g de cinzas (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2013).

3.2.9 Condutividade elétrica

A medida de condutividade elétrica quantifica todas as substâncias orgânicas e inorgânicas ionizáveis, ou seja, é a medida de todos os íons que conduzem eletricidade em uma solução. Pode ser expressa como S/cm (Siemens/cm), mS/cm (milisiemens/cm) ou μ S/cm (microsiemens) (YADATA,2014).

A condutividade elétrica é considerada um bom critério para a determinação botânica do mel que pode ser utilizado também como análise de rotina em um laboratório de controle de qualidade (BOGDANOV,2002).

As diferenças encontradas nos méis são atribuíveis às diferentes origens geográficas e botânicas. Pesquisas defendem que altos teores de condutividade elétrica podem também estar relacionados à origem floral, ao teor de ácidos orgânicos e proteína e o tempo de armazenamento do mel (SOUSA et al.,2016).

Assim sendo, o teor de cinzas e a condutividade elétrica são parâmetros relacionados ao teor de minerais presentes no mel (SUNTIPARAPOP et al.,2012).

Análises de condutividade elétrica realizadas em méis de jandaíra e uruçú apresentaram resultados que variaram de 300 a 600 μ S/cm (SOUSA et al.,2016). Resultados similares de 267,50 a 462 μ S/cm foram encontrados em méis de *Melipona mandacaia*, do estado da Bahia, Brasil (ALVES et al.,2005).

3.2.10 Atividade diastásica

As diastases são um grupo de enzimas, que incluem a α e β -amilase, as quais realizam a hidrólise do amido. A α -amilase hidrolisa a cadeia de amido em pontos aleatórios, produzindo diversas dextrinas e a β -amilase hidrolisa a maltose no final da cadeia do amido (SAK-BOSNAR,SAKAČ,2012).

A diastase é proveniente da saliva das abelhas, a enzima entra em contato com a colmeia no momento em que a abelha concentra o néctar coletado, convertendo-o em mel (CHUTTONG et al.,2015). O teor de diastase encontrado em méis é dependente das condições geográficas e de sua origem floral (AHMED et al.,2013).

Sua relevância principal é a sensibilidade ao calor (termolábil) e ao tempo de armazenamento, conseqüentemente é utilizado como indicativo do grau de conservação e superaquecimento do mel. Devido à essa característica, é um parâmetro de qualidade relacionado ao frescor de mel proveniente de *A. mellifera* (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2013).

Na determinação diastásica, o resultado mostra a atividade da diastase em ml de solução de amido 1% hidrolisado em 1 g de mel, na temperatura de 40°C por 1 hora. O resultado é expresso em °Gothe (CHUTTONG et al.,2015).

Em dois estudos encontrados na literatura, não foi identificada a atividade diastásica em mel de *Melipona* in natura analisado à temperatura ambiente, devido à ausência da enzima neste gênero de abelhas (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2013;VIT et al.,1994). Entretanto a diastase foi reportada em méis provenientes de abelhas do gênero *Trigona*, com valores médios de 7 unidades Gothe, conforme relatado no mesmo trabalho por (VIT et al.,1994). Os índices de diastase detectados em amostras de méis in natura, analisados à temperatura ambiente, provenientes de *Melipona fasciculata* do estado do Maranhão, Brasil, variaram de 0,60 a 2,93 Gothe (HOLANDA et al.,2012).

A necessidade desta análise como parâmetro de qualidade para os méis de abelhas sem ferrão deve ser estudada (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2013).

3.3 Micro-organismos associados ao mel de abelhas sem ferrão

Na literatura são relatados diversos micro-organismos que estão naturalmente presentes nas colônias das abelhas sem ferrão como leveduras, bolores e bactérias. Em tais pesquisas, são descritos apenas a ocorrência destes micro-organismos, entretanto, com atividade metabólica inibida (MENEZES et al.,2013). Conforme discutido anteriormente, por apresentar atividade de água superior a 0,6; o mel de abelhas sem ferrão não é microbiologicamente estável. A faixa de a_w de 0,6 a 0,8 encontrada para este mel em diversos trabalhos mostra a limitação do crescimento de micro-organismos patógenos, como *Salmonella spp.* e

E. coli, porém permite o desenvolvimento de outros, como por exemplo as leveduras osmofílicas (ALMEIDA-MURADIAN,MATSUDA,2007;ANACLETO et al.,2009;LAGE et al.,2012;SILVA,2011;SILVA et al.,2013b).

Na sequência são abordados os principais micro-organismos relacionados aos méis de abelhas sem ferrão, abordando as condições ideais para seu desenvolvimento e os parâmetros de resistência térmica (D e z), que são importantes para o dimensionamento de um tratamento térmico de um alimento. O tempo de redução decimal, ou valor D, é definido como o intervalo de tempo que ocasiona uma redução de 10 vezes (ou 1 ciclo logarítmico) na concentração do micro-organismo, numa temperatura constante. O valor z é o intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de transformação (valor D), conforme será discutido nos próximos itens (FELLOWS,2006).

3.3.1 Bactérias

- ***Salmonella spp.***: é uma bactéria patogênica, gênero pertencente da família *Enterobacteriaceae*, definido como bastonetes Gram negativo, não esporogênicos, anaeróbicos facultativos (SILVA et al.,2010). Possui resistência térmica de $D_{65,6^{\circ}\text{C}}=0,02$ a $0,25$ minutos e valor $z=4,5$ a $5,6^{\circ}\text{C}$ (STUMBO,1973). Apresenta desenvolvimento ótimo nas condições de pH entre 4,5 a 5,0; $a_w=0,94$ e temperatura de 35 a 43°C (SILVA et al.,2010).

- **Micro-organismos aeróbios mesófilos**: é um método comumente utilizado como indicador geral de populações bacterianas e não possui um micro-organismo específico e não diferencia tipos de bactérias (FORSYTHE,2010).

O objetivo desta análise compreende a obtenção de informações gerais sobre a qualidade do produto, práticas de beneficiamento, condições do processamento e manipulação. Altas populações de bactérias podem indicar deficiências na sanitização ou falha no processamento. Não é um indicativo de segurança, pois não está relacionado à presença de patógenos ou toxinas. Produtos fermentados apresentam elevadas populações de mesófilos, não apresentando qualquer relação com qualidade (SILVA et al.,2010).

- **Coliformes totais**: grupo composto por bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas, sendo incluídas apenas as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24 a 48 horas a 35°C , tais como os gêneros:

Escherischia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter e *E. coli* (FORSYTHE,2010;SILVA et al.,2010).

- **Coliformes termotolerantes:** é um subgrupo dos coliformes totais, que incluem os micro-organismos capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C com produção de gás. Os grupos de coliformes totais e termotolerantes são utilizados como indicadores, pois:

- a) Enterobactérias e coliformes indicadores: podem ser utilizados como indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação. São capazes de colonizar vários locais da planta de processamento, quando a sanitização é falha. Isso pode ser evitado pelo tratamento térmico adequadamente aplicado e ou inativados pelo uso de sanitizante (SILVA et al.,2010);
- b) Coliformes: são indicadores de falha de processo ou contaminação pós-processo em alimentos pasteurizados, porque são micro-organismos facilmente destruídos pelo calor e não deve sobreviver ao tratamento térmico (SILVA et al.,2010).
- c) *Escherischia coli*: é uma bactéria patogênica, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, definido como bastonetes Gram negativos anaeróbios facultativos, classificado como um micro-organismo de risco de saúde pública (SILVA et al.,2010). Indicador de contaminação fecal em alimentos *in natura*, mas não em alimentos processados (PUCCIARELLI et al.,2014). Possui resistência térmica $D_{62,8^{\circ}\text{C}}=0,4$ minutos e $z=4,65^{\circ}\text{C}$. As condições ótimas de crescimento compreendem: $a_w=0,96$; pH=4,3 a 4,4 e temperatura de 35 a 40°C (SILVA et al.,2010).

3.3.2 Bolores e leveduras

Constituem um grupo de micro-organismos originários em sua maioria do solo ou do ar. Os bolores são muito versáteis, capazes de assimilar qualquer fonte de carbono originária de alimentos. As leveduras são mais exigentes com relação a nutrientes quando comparadas aos bolores. Esse fator limita uma variedade de alimentos susceptíveis a deterioração por leveduras. São resistentes ao pH ácido (variação na faixa de 3,0 a 8,0) e atividade de água baixa. A temperatura ótima de crescimento encontra-se na faixa de 25 a 28°C. Quanto às exigências de oxigênio para crescimento, os bolores deteriorantes são considerados aeróbios estritos enquanto que muitas espécies de leveduras são capazes de se desenvolver na ausência de O_2 . De modo geral, as leveduras são mais competitivas em alimentos

líquidos, pois proporciona maior oportunidade de desenvolvimento em condições anaeróbias, condição ideal para as leveduras fermentativas (SILVA et al.,2010).

As leveduras realizam primeiramente a metabolização de açúcares e outros nutrientes presentes no meio para obter energia e aumentar sua população, conforme a Figura 1, onde mostra o crescimento clássico de leveduras em condições favoráveis de crescimento (ZAMORA,2009).

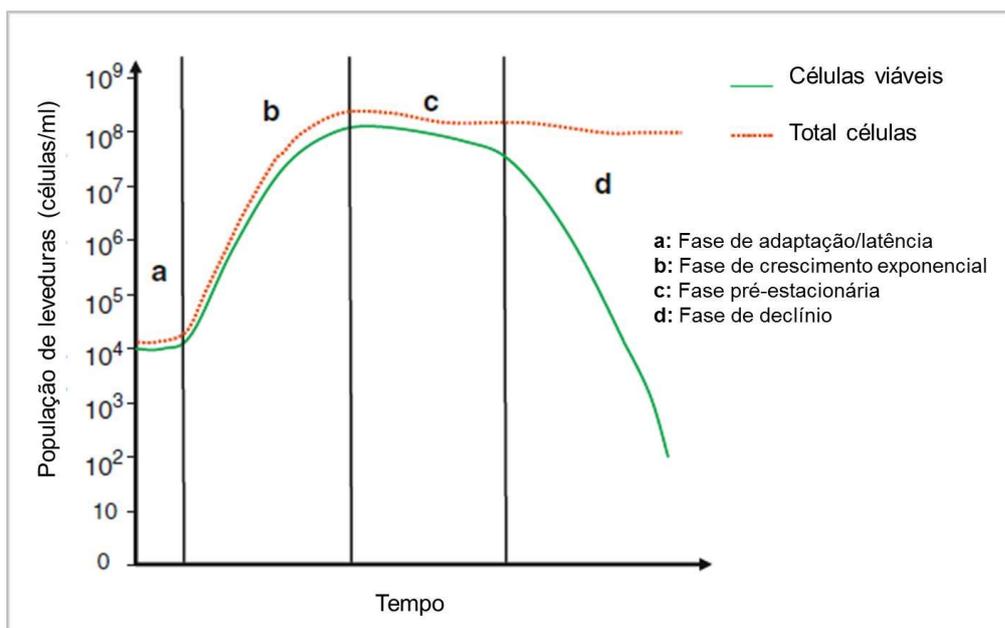


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de leveduras em função do tempo. Fonte: (ZAMORA,2009).

Durante a fase de adaptação ou latência, as leveduras não se desenvolvem por algumas horas, pois é necessário que as células se adaptem às condições ambientais. Na fase de crescimento (b), as células iniciam seu desenvolvimento, que está altamente relacionado à influência da temperatura e pela presença de oxigênio. Posteriormente o desenvolvimento é desacelerado devido à baixa disponibilidade de nutrientes, e conseqüentemente, na fase (c), a população de leveduras remanescentes reduz até atingir a fase (d) em que ocorre a morte de células pela falta de nutrientes e teor de etanol e outras substâncias produzidas durante a fermentação alcoólica, as quais são tóxicas para o metabolismo das leveduras (ZAMORA,2009).

Faixas de valores de D de 0,5 a 3 minutos e valores z de 5,5 a 6,7°C são citadas para bactérias não esporuladas, leveduras e fungos (STUMBO,1973).

- **Leveduras osmofílicas:** São leveduras que apresentam desenvolvimento ótimo em ambientes com alta osmolaridade, como alimentos que contêm altas

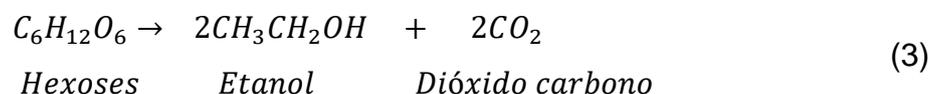
concentrações de açúcares. São frequentemente associados à deterioração fermentativa em produtos como sucos de frutas, concentrados de frutas, xaropes, molhos, bebidas alcóolicas, mel, geleia e confeitos (BOEKHOUT,ROBERT,2003).

O mel é um substrato muito favorável para o desenvolvimento destas leveduras principalmente em função de sua composição de açúcares redutores (glicose e frutose) e água (DOWNES,ITO,2001).

As leveduras são introduzidas no mel pelo néctar/pólen ou através de técnicas precárias pós-colheita (PRAKASH et al.,2016).

O gênero *Zygosaccharomyces* consiste em seis espécies, dentre elas, as mais relevantes são *Z. bailli* e *Z. rouxii*. A identificação destas leveduras é baseada na inoculação em meios de cultura com alta concentração de glicose (SILVA et al.,2010).

Em relação à atividade metabólica, o *Zygosaccharomyces* realiza a fermentação de hexoses em etanol e dióxido de carbono. Este processo pode ser realizado pelas leveduras de acordo com a Equação 3. Além do etanol, são produzidos metabólitos secundários, tais como ácido acético, ésteres e glicerol (BEVILACQUA et al.,2016;ZAMORA,2009).



O dióxido de carbono é um fator de atenção principalmente em embalagens fechadas hermeticamente ou seladas. Com o aumento de gás, pode ocorrer vazamento ou em casos extremos o rompimento da embalagem. Pode ocorrer também sedimentação ou aumento na turbidez em função do acúmulo de células e em alguns casos há formação de biofilmes na superfície do produto (BEVILACQUA et al.,2016).

Em relação à respiração, algumas espécies de *Zygosaccharomyces* são capazes de se desenvolver em condições anaeróbicas enquanto que o *Z. bailli* consegue fermentar sob diversas condições de CO₂, em faixas de atividade de água extremas (DOWNES,ITO,2001).

Nos próximos itens serão abordadas as espécies de maior relevância dentre as leveduras xerofílicas.

a) *Zygosaccharomyces bailli*: é a principal levedura associada à deterioração de alimentos, capaz de desenvolver em condições ácidas e com elevados

teores de açúcares, entretanto é incapaz de utilizar a sacarose como fonte exclusiva de carbono. No processo de fermentação, realiza vigorosamente a hidrólise da glicose com produção de álcool e gás carbônico (SILVA et al.,2010). Na presença de oxigênio o álcool pode ser convertido em ácido acético (SEREIA et al.,2011). É uma levedura xerofílica, pois se desenvolve em atividade de água na ordem de 0,80 a 25°C e 0,86 a 30°C e mesofílica (apresenta temperatura de crescimento na faixa de 5 a 40°C) (SILVA et al.,2010). Apresenta baixa resistência térmica $D_{60^{\circ}\text{C}}=0,4$ minutos; valor $z=3,9^{\circ}\text{C}$ e pH mínimo de desenvolvimento de 2,2 a 2,5, conforme Tabela 4. É resistente a maioria dos conservantes como os ácidos sórbico, benzóico, acético, propiônico e dióxido de enxofre. Apresenta mecanismos de adaptação aos conservantes.

b) *Zygosaccharomyces rouxii*: é a segunda levedura mais frequentemente associada à deterioração de alimentos devido à sua capacidade de fermentar vigorosamente a hexose e é extremamente resistente à baixa atividade de água (PITT,HOCKING,2009). É capaz de se desenvolver em a_w de até 0,62 em soluções de frutose. A temperatura ótima de desenvolvimento varia com a a_w , de 24°C em 10% (peso/peso) de glicose ($a_w=0,99$) até 33°C em 60% (m/m) de glicose ($a_w=0,87$). A temperatura mínima de crescimento é de 7°C em um meio contendo 60% de glicose (PITT,HOCKING,2009). A resistência térmica varia de acordo com o substrato, sendo maior na presença de glicose, frutose ou glicerol (a_w 0,95/ $D_{65^{\circ}\text{C}}=0,2-0,6$ minutos) e $D_{65,5^{\circ}\text{C}}= 0,4$ minutos e $z=8$ minutos (SILVA et al.,2010); (PITT,HOCKING,2009). O *Z. rouxii* é frequentemente associado à deterioração de alimentos processados, dentre os quais incluem-se caldo de cana, extrato de malte, sucos de frutas concentrados, coberturas e caldas carameladas, xaropes de açúcar (SILVA et al.,2010).

Na literatura o *Z. rouxii* é usualmente encontrado em mel, apesar de outras espécies osmofílicas como *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Nematospora*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces* também terem sido relatadas (ROSA,PÉTER,2006).

A alternativa mais segura para a eliminação das leveduras osmofílicas é a pasteurização na embalagem final. Caso o tratamento térmico seja realizado antes

do envase, é necessária a manutenção de um programa de Boas Práticas de Fabricação para prevenção de focos de contaminação. A refrigeração também é indicada para a diminuição da atividade metabólica das leveduras (SILVA et al.,2010).

Neste cenário, para que o mel de abelhas sem ferrão mantenha suas características sensoriais e ao mesmo tempo seja considerado seguro para o consumo, há necessidade da aplicação de uma tecnologia de conservação.

Recomenda-se também a implantação de boas práticas de produção do mel desde a construção do meliponário até a colheita, incluindo etapas de beneficiamento e armazenamento do mel, visando a redução da contaminação por micro-organismos (WITTER,NUNES-SILVA,2014).

O item a seguir aborda algumas tecnologias de processamento já aplicadas neste produto, porém, na maioria dos casos, de forma empírica. O estudo de uma aplicação correta destes processamentos e a compreensão de seus efeitos na qualidade e longevidade do mel é salutar para a adequada comercialização deste produto, sendo, portanto, o foco desta dissertação de mestrado.

3.4 Tecnologias de processamento para conservação de mel de abelhas sem ferrão

As tecnologias de conservação de alimentos têm como objetivo a extensão do tempo de vida de prateleira permitindo o armazenamento e distribuição adequados, sendo que a atividade microbiana é a principal fonte de limitação de um alimento (KAREL,LUND,2003).

De modo geral, as etapas de manuseio, processo, armazenamento e distribuição afetam as características do alimento, as quais podem ser desejáveis ou não. Dessa maneira, entender os efeitos de cada método de conservação é imprescindível para realizar a escolha da metodologia mais adequada (RAHMAN,2007).

As diferentes técnicas que são apresentadas a seguir representam as tecnologias relatadas na literatura com aplicação em mel de abelhas sem ferrão. Essas tecnologias podem ser consideradas na regulamentação do mel, com o intuito de oferecer ao meliponicultor opções de processamentos para a comercialização de um produto seguro.

3.4.1 Processamento pela remoção de água: Desidratação

A desidratação é um processo que consiste na redução do teor de água do mel, impedindo assim sua deterioração (SEMKIW et al.,2010). No caso do mel de abelhas sem ferrão, é um processo que pode proporcionar maior vida útil ao produto, desde que o teor de umidade seja inferior a 20% (SILVA,2015). O mel proveniente deste processo é também conhecido como mel desumidificado em função da utilização de um desumidificador (VENTURIERI et al.,2007).

Na literatura alguns trabalhos relatam o processo de desidratação realizado em uma sala com desumidificador, na temperatura de 30°C e umidade a 40% conforme relatado na sequência (ALVES et al.,2012;OLIVEIRA et al.,2013;SODRE et al.,2008).

No estudo sobre a estabilidade físico-química e sensorial de méis desidratados de *Tetragonisca angustula* (envasados em frascos de vidro de 200 g, fechados hermeticamente, armazenados em incubadora B.O.D) avaliado ao longo de 180 dias, foi observado que o uso da desidratação associado ao armazenamento mostrou ser um procedimento viável para aumentar a vida pós-colheita do mel. Os resultados obtidos mostraram variação de 17,05 a 17,50% no teor de umidade (ALVES et al.,2012).

Na avaliação do perfil sensorial e a aceitabilidade de amostras de *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata* submetidos à desidratação, foram analisados os atributos de fluidez, cor, aroma, cristalização, sabor e aceitabilidade. Os resultados mostraram que as amostras de méis desidratados apresentaram boa aceitabilidade, o teor de umidade não foi avaliado. A principal vantagem deste processo, segundo o autor, é a extensão de vida de prateleira (SODRE et al.,2008).

A utilização de incubadora com Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O), na temperatura de 35°C e umidade de 40% é citada em outros trabalhos abordados na sequência (CARVALHO et al.,2009;OLIVEIRA et al.,2013).

Na pesquisa conduzida para avaliação do efeito do processo de desidratação nas características físico-químicas e sensoriais de amostras de *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata*, o autor conclui que o processo aplicado não interferiu nos resultados obtidos em relação à qualidade e aceitabilidade do mel. Os teores de umidade variaram entre 16-16,5% (CARVALHO et al.,2009).

Em outro estudo, foi analisado o processo de desidratação em amostras de *M. quadrifasciata* por meio do perfil sensorial e aceitabilidade. Quatro condições foram avaliadas, sendo T01: amostra mantida a 25°C, T02: amostra mantida 5°C durante 7 dias, T03: amostra desumidificada em sala com desumidificador de ar, à 30°C e 40% de umidade relativa e T04: amostra desidratada em B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio). De acordo com os resultados obtidos, os métodos de desidratação apresentaram boa aceitabilidade entre os provadores. Os teores de umidade apresentaram resultados entre 16 e 18%. Conforme relatado, a desidratação elevou a concentração dos compostos presentes no mel, tornando o sabor mais intenso. Foram obtidos valores de umidade de 16 e 18% nos tratamentos T03 e T04, respectivamente. O tratamento aplicado não interferiu no perfil sensorial e na aceitabilidade do mel (OLIVEIRA et al.,2013).

Em todos os trabalhos relatados não foi realizada a análise de atividade de água, somente o teor de umidade foi o parâmetro utilizado para o processo de desidratação. Esse processo, entretanto, é questionável quando objetivo é manter e enaltecer as peculiaridades deste tipo de mel, relacionadas com a maior fluidez e sabor diferenciado, originário de seus teores originais de acidez e umidade.

3.4.2 Processo fermentativo: Maturação

A maturação é definida como um processo fermentativo que ocorre naturalmente após a colheita do mel, à temperatura ambiente, o qual é mantido em recipientes que são periodicamente abertos para a remoção de gases formados pela fermentação até cessar a produção de gás (CONTRERA et al.,2011;MENEZES et al.,2013).

A fermentação é definida como um processo bioquímico que transforma os carboidratos em outras substâncias, fornecendo energia para os micro-organismos. Existem três principais categorias de fermentação: (1) alcoólica onde os carboidratos são convertidos em álcool e CO₂; (2) acética, na qual o álcool é transformado em ácido acético e (3) láctica, ocorre a conversão de carboidratos em ácido láctico e outros produtos orgânicos (MENEZES et al.,2013).

No estado do Maranhão, a maturação é uma técnica que está sendo aprimorada com base nos costumes tradicionais de povos indígenas. O mel maturado tem ganhado destaque em feiras e eventos, devido às suas características distintas de acidez e traços alcóolicos. A técnica de maturação aplicada consiste em

quatro etapas: (1) a coleta do mel e armazenamento em garrafas PET com capacidade de 500 ml; (2) acondicionamento das garrafas ao abrigo da luz (em uma caixa de isopor) à aproximadamente 30°C; (3) a liberação de CO₂ produzido através do afrouxamento das tampas quinze dias após o acondicionamento e semanalmente por um período de 3 a 6 meses, até cessar a liberação de gás; (4) envase e comercialização do mel maturado (VILLAS-BÔAS,2012).

Coletas de mel de abelhas nativas no período de 2001 a 2010 em comunidades rurais do nordeste do Maranhão foram maturadas conforme metodologia descrita anteriormente, com alteração apenas na temperatura de armazenamento das garrafas em temperatura ambiente. De forma subjetiva o autor concluiu que a principal vantagem do método é o baixo custo e a formação de sabor e aroma diferenciados (DRUMMOND,2010).

No estudo realizado visando esclarecer o efeito da fermentação sobre a capacidade antioxidante de mel de *Tetragonisca angustula Latreille, 1811*, foram avaliados o mel *in natura* e pasteurizado, armazenados à 4°C e 30°C durante 30 dias. As metodologias de maturação e pasteurização não foram abordadas no artigo. Os resultados mostraram que a fermentação não ocorreu em méis pasteurizados e no mel *in natura* a 4°C. Na amostra mantida à 30°C, a fermentação elevou os teores de álcool, diminuindo conseqüentemente a quantidade de açúcar. Contudo, a capacidade antioxidante foi maior nesta amostra em relação às demais (PÉREZ-PÉREZ et al.,2007).

Devido à diversidade de abelhas sem ferrão e aos estudos limitados em seus micro-organismos, o processo de maturação do mel ainda não é compreendido. São necessários estudos para melhor entendimento dos processos biológicos e bioquímicos envolvidos na fermentação e armazenamento do mel de abelhas sem ferrão (MENEZES et al.,2013).

3.4.3 Processamento pela aplicação de calor: Pasteurização

As tecnologias térmicas têm sido os principais meios de produção e conservação de alimentos de maior predominância utilizados na indústria de alimentos. Dois processos amplamente utilizados são a esterilização e a pasteurização, que, a partir de uma fonte de calor durante o processamento destroem micro-organismos e enzimas presentes nos alimentos (FELLOWS,2006;RICHARDSON,2004).

A esterilização é utilizada para a destruição de esporos bacterianos (STUMBO,1973). Já a pasteurização é aplicada para a destruição de microorganismos patogênicos e deteriorantes não formadores de esporos, retarda ou inibe reações enzimáticas, visando a segurança do alimento e consequente prolongamento de vida de prateleira (SINGH,HELDMAN,2009).

A principal diferença entre esses processos é o fato de o primeiro ser menos intenso em relação às temperaturas empregadas que o segundo, uma vez que está fundamentado na destruição da microbiota patogênica e deteriorante apenas em sua forma vegetativa, enquanto que o processo de esterilização visa também a destruição de esporos bacterianos (BLACK,BARACH,2015).

É um processo geralmente combinado com outros métodos de conservação, como a acidificação, a redução da atividade de água, adição de conservantes e refrigeração. As aplicações destas tecnologias associadas garantem a inibição do desenvolvimento microbiano durante a vida de prateleira do produto (OLIVEIRA,OLIVEIRA,1999;POTTER,HOTCHKISS,1995).

Devido à escassez de estudos sobre o tratamento térmico em méis de abelha sem ferrão, foram consultados na literatura binômios de tempo e temperatura para o mel proveniente de *A.mellifera*. De acordo com estes estudos, a pasteurização do mel de abelhas africanizadas visam a eliminação de leveduras osmofílicas; a dissolução de núcleos de cristais de açúcar, retardando a cristalização e a diminuição da viscosidade, facilitando o envase do produto (CHUA et al.,2014;GUO et al.,2011;KHAN et al.,2015;SINGH et al.,1988). A Tabela 3 apresenta algumas combinações de binômios (tempo e temperatura) reportados em estudos.

Tabela 3. Binômios de tempo e temperatura relatados na literatura para méis de abelha provenientes de *A. mellifera* e abelha sem ferrão (ASF).

Origem	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Referência
<i>A. mellifera</i>	60	30,00	(EUA,2005)
	63	30,00	(NOGUEIRA-NETO,1997)
			(LABROPOLUS,ANESTIS,2012) (MENEZES et al.,2013)
Abelhas sem ferrão	65	5,00	(VENTURIERI et al.,2007)
		**	(VENTURIERI,2008)
		**	(VILLAS-BÔAS,2012)
		**	(WITTER,NUNES-SILVA,2014)
	70	1,00	(SODRE et al.,2008)
<i>A. mellifera</i>	71	1,00	(EUA,2005)
	72	0,25	(MENEZES et al.,2013)
			(NOGUEIRA-NETO,1997)
	75	10,00	(VENTURIERI,2008)
	77	0,016	(LABROPOLUS,ANESTIS,2012)
78	6,00 a 8,00	(GONNET,LAVIE,1964)	

**O tempo (minutos) não foi indicado na literatura.

Em algumas literaturas indica-se que a temperatura da pasteurização não ultrapasse 65°C para a manutenção das características sensoriais e físico-químicas do mel (EUA,2005;VILLAS-BÔAS,2012;WITTER,NUNES-SILVA,2014).

Também é indicado na literatura que na pasteurização de produtos susceptíveis a deterioração fermentativa por *Z. bailli*, deve ser realizado o tratamento térmico do produto na embalagem final, garantindo-se a manutenção de temperaturas de 65 a 68°C no centro da embalagem (SILVA et al.,2010).

Na sequência estão relatados alguns trabalhos encontrados na literatura em relação ao tratamento térmico de mel de abelhas sem ferrão.

Os teores de açúcares (frutose, glicose e sacarose) e hidroximetilfurfural (HMF) de trinta amostras de méis de abelhas sem ferrão antes e após a pasteurização foram avaliados utilizando o método de eletroforese capilar (BILUCA et al.,2014). As amostras foram coletadas e armazenadas a -18°C até a realização dos ensaios. Foram adicionados 0,5 g da amostra em um tubo de ensaio homogeneizados com 0,5 g de água deionizada para a condução das análises. Os tubos de ensaio foram aquecidos em banho maria. Para o monitoramento da temperatura, foi inserido um termômetro no centro geométrico de um dos tubos de ensaio, o qual foi mantido aberto até atingir os binômios de tempo/temperatura estabelecidos nas seguintes condições: 75°C durante 20 e 60 segundos; 85°C por

40 segundos e 95°C durante 20 e 60 segundos. Após o tratamento térmico, os tubos de ensaio foram resfriados até a temperatura ambiente. Os resultados mostraram que, em treze amostras de méis in natura, o teor de HMF ficou abaixo do limite de quantificação do método e os carboidratos variaram de 48,59% a 69,36%, sendo que a frutose foi o açúcar encontrado em maior quantidade em relação à glicose. Em amostras de méis de abelha sem ferrão pasteurizadas, o teor de HMF também manteve-se abaixo do limite de quantificação do método, em todos os binômios estudados. Os teores de frutose e glicose variaram de 59,80 a 71,72%. Dessa forma, o autor pode concluir que tratamento térmico foi eficiente para prolongar a vida útil do mel sem alterar os teores de HMF (BILUCA et al.,2014).

A aceitabilidade de amostras pasteurizadas de *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata* foram avaliadas em méis coletados por uma bomba de sucção, armazenados sob-refrigeração por sete dias e submetidos à pasteurização (SODRE et al.,2008). Neste trabalho a metodologia empregada no tratamento térmico não foi abordada, no entanto, o autor citou a utilização do binômio tempo/temperatura de 70°C durante um minuto (NOGUEIRA-NETO,1997). Nesta recomendação é indicado o aquecimento por “banho maria”, seguido do resfriamento realizado à temperatura ambiente. Vale ressaltar que o monitoramento do tempo/temperatura é imprescindível para a definição dos parâmetros de intensidade do tratamento térmico em função do micro-organismo alvo. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento térmico aplicado não interferiu nos atributos cristalização, sabor e aceitabilidade (SODRE et al.,2008).

Como o adequado dimensionamento do tratamento térmico está baseado no cálculo da letalidade do processo em função do conhecimento da resistência térmica dos micro-organismos alvos do produto, uma breve revisão sobre esse assunto é mostrada na sequência.

3.4.3.1 Valor P: Cálculo da Intensidade do Processo Térmico

A escolha do tempo e da temperatura a serem usados no tratamento térmico depende das características do próprio alimento, do micro-organismo alvo e do emprego ou não de outros métodos combinados de conservação. O binômio adequado deverá ser definido com o objetivo de o produto não apresentar riscos microbiológicos e de minimizar os efeitos na qualidade sensorial e nutricional do alimento (BLACK,BARACH,2015).

Para se estabelecer e/ou calcular a intensidade ou letalidade de um processo térmico é necessário conhecer a resistência de destruição térmica dos micro-organismos alvos, ou seja, os valores do tempo de redução decimal (D) e da constante de resistência térmica (z) (BLACK,BARACH,2015).

O valor D é definido como o tempo necessário em qualquer temperatura de referência designada para destruir 90% dos esporos ou células vegetativas de um determinado micro-organismo. A constante de resistência térmica (z) é definida como o aumento de temperatura necessário para a redução de 90% do valor D (STUMBO,1973).

A letalidade térmica ou intensidade do processo térmico é o valor equivalente em minutos, em uma determinada temperatura de referência no que diz respeito à sua capacidade de destruir esporos ou células vegetativas de um determinado micro-organismo (STUMBO,1973).

Nos processos de esterilização, o valor da letalidade é calculado com base nos parâmetros de resistência de destruição térmica dos micro-organismos alvos patogênico, *Clostridium botulinum* e deteriorante, *Clostridium sporogenes*, utilizando como temperatura de referência 121,1°C e valor de z=10°C. Neste caso, a letalidade é referenciada como F₀ (STUMBO,1973). Para os processos de pasteurização, utiliza-se valor P.

O valor de F₀ e/ou P experimental é calculado através da integração da taxa letal (TL) em função do tempo, de acordo com a Equação 4, o qual é a relação entre as reduções decimais na temperatura de referência (D_{Tref}) e na temperatura do ponto frio do produto (D_T) (STUMBO,1973).

$$TL = \frac{D_{Tref}}{D_T} = 10^{\frac{T_P - T_{ref}}{z}} =$$

$$F \text{ ou } P = \int_{t_0}^t TL \cdot dt \quad (4)$$

Sendo:

TL = taxa letal (adimensional);

D_{Tref} = valor D na temperatura de referência;

D_T = valor D na temperatura do ponto de aquecimento mais lento do produto;

T_{ref} = a temperatura de referência (°C);

T_P = a temperatura do produto no interior da embalagem (°C);

z = valor Z, que é específico para o micro-organismo (°C);

Valor F_0 ou $P =$ é expresso na mesma unidade do tempo t , geralmente em minutos.

O histórico de tempo/temperatura do produto para cálculo da letalidade (valor F_0 ou P) deve ser obtido com dados de temperatura no ponto de aquecimento mais lento da embalagem. Estudos demonstram que, em produtos condutivos, o ponto de aquecimento mais lento corresponde ao centro geométrico da embalagem e em produtos convectivos a localização do ponto de aquecimento mais lento é no eixo radial, aproximadamente na altura de $\frac{1}{3}$ a partir do fundo da embalagem. Contudo, para produtos não homogêneos, como por exemplo, um componente líquido (salmoura, molhos, entre outros) e um componente sólido, esta região não é pré-definida e deve ser estudada para cada sistema (QUAST,1976;STUMBO,1973).

A relação entre o valor da letalidade experimental (valor F_0 ou P) e o valor D do micro-organismo alvo pode-se calcular o número de reduções decimais (valor n) ocasionados pelo tratamento térmico, conforme Equação 5.

$$n = \frac{P}{D} \text{ ou } n = \frac{F}{D} \quad (5)$$

A redução de 12 a 15 ciclos é considerada apropriada para micro-organismos patogênicos, enquanto que, para os micro-organismos deteriorantes, a redução de 5 a 10 D é recomendada (STUMBO,1973).

Em produtos de baixa acidez ($\text{pH}>4,6$), é indicada a redução de 12 D de esporos *Clostridium botulinum*. Alimentos com valores de $\text{pH}<4,6$ permitem a utilização de um tratamento térmico menos severo (BLACK,BARACH,2015).

Na pasteurização o micro-organismo alvo não é unânime, sendo que o mesmo depende das características do alimento.

Na Tabela 4 são apresentadas as faixas de valores de resistências térmicas (D e z) dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes considerados importantes para o mel de abelhas sem ferrão.

Tabela 4. Resistência térmica e valores de atividade de água (a_w) e pH de micro-organismos.

Micro-organismos	T_{ref} (°C)	Valor D (minutos)	Valor z (°C)	Referência D, z	A_w	pH	Referência a_w , pH
Bactérias patogênicas							
<i>Salmonella spp.</i>	65,6	0,02-0,25	4,5-5,60	(1)	0,94	3,8-7,5	(4)
<i>Escherischia coli</i> O157:H7	62,8	0,40	4,65	(2)	0,96	4,3-4,4	(4)
Micro-organismos deteriorantes							
<i>Zygosaccharomyces bailli</i> (células vegetativas)	60,0	0,40	3,90	(3)	0,87-0,94	2,5-7,0	(6)
<i>Z. bailli</i> (ascosporos)	60,0	14,2	3,90	(3)	-	-	-
<i>Z. rouxii</i>	65,5	0,40	8,00	(4) e (5)	0,65-0,86	2,50-7,5	(7)
<i>Bactérias não esporuladas, leveduras e fungos</i>	65,6	0,50-3,0	4,5-6,70	(1)	-	-	-

(1) (STUMBO,1973); (2) (FORSYTHE,2010); (3) (TUCKER,2016); (4) (SILVA et al.,2010); (5) (PITT,HOCKING,2009); (6) (KURTZMAN et al.,2011).

3.4.4 Condição de armazenamento: Resfriamento

O resfriamento é definido como um processamento na qual a temperatura do alimento é reduzida entre -1°C e 8°C , o qual visa a redução de taxas de variações biológicas e microbiológicas, e conseqüentemente, prolonga a vida de prateleira de alimentos *in natura* e processados. É um processo comumente utilizado em combinação com outros métodos de conservação (FELLOWS,2006).

Micro-organismos termófilos, mesófilos e enzimas são inibidos a baixas temperaturas, no entanto, diferente do tratamento térmico, eles não são destruídos. Qualquer abuso de temperatura pode permitir o desenvolvimento das bactérias patogênicas e/ou micro-organismos deteriorantes presentes no alimento (FRANCO,LANGRAF,2002).

Algumas espécies podem se desenvolver em baixas temperaturas durante armazenagens refrigeradas abaixo de 5°C , alguns exemplos destes patógenos são: *Listeria spp.*, alguns tipos de *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherischia coli* (MARTH,1998).

Deve-se ter o controle da cadeia do frio para a manutenção da temperatura e seguir os preceitos das Boas Práticas de Fabricação (BPF).

A refrigeração é a alternativa mais comum, encontrada na literatura para a manutenção e conservação de méis de abelha sem ferrão (SODRE et al.,2008).

Duas desvantagens são destacadas do uso da refrigeração: o custo de manutenção da cadeia do frio antes da comercialização e caso o mel seja coletado com procedimentos de higiene precários, os micro-organismos permanecerão no produto (MENEZES et al.,2013). A refrigeração do mel é recomendada na faixa de 4 a 8°C logo após a colheita até o consumo, caso a única barreira de conservação seja a temperatura (VENTURIERI,2008).

Na literatura foram reportados alguns trabalhos em relação a utilização da refrigeração em mel de abelhas sem ferrão, conforme apresentado na sequência.

O efeito de diferentes técnicas de conservação (temperatura ambiente, refrigeração e congelamento) foi investigado em méis de *Melipona subnitida* durante um ano. Foi verificado que o elevado teor de umidade encontrado em méis mantidos sob-refrigeração pode ter ocorrido em função da cristalização, devido à coexistência de duas fases durante certo tempo. Na fase líquida ocorre um aumento na atividade de água como consequência da formação de cristais remanescentes da fase sólida (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2014).

A respeito da combinação da refrigeração associada a outros métodos de conservação, ressalta-se que, mesmo com a pasteurização do mel, após a abertura do recipiente é necessário conservá-lo sob-refrigeração para evitar processos de deterioração (SODRE et al.,2008).

Em relação às características físico-químicas, a refrigeração é eficiente na redução da velocidade de formação de hidroximetilfurfural quando comparado ao mel mantido ao armazenamento à temperatura ambiente. Entretanto a refrigeração pode acelerar o processo de cristalização, havendo neste caso, a necessidade de aquecimento para a descristalização do mel (MOURA,2006).

3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Como a CLAE foi a técnica utilizada para a quantificação de ácidos e álcool das amostras desse trabalho de dissertação, uma breve revisão sobre esse assunto se fez necessária.

A cromatografia líquida é uma técnica de separação onde um pequeno volume de amostra líquida é injetado em uma coluna empacotada com partículas porosas (fase estacionária) sob alta pressão. Os componentes individuais da amostra são arrastados por uma fase móvel líquida e seletivamente são separados em função das interações químicas e físicas pela fase estacionária. Os

componentes da amostra separados são coletados na saída da coluna e identificados num detector (JARDIM et al.,2014). O esquema simplificado é mostrado na Figura 2, onde as linhas tracejadas indicam possíveis controles de temperatura.

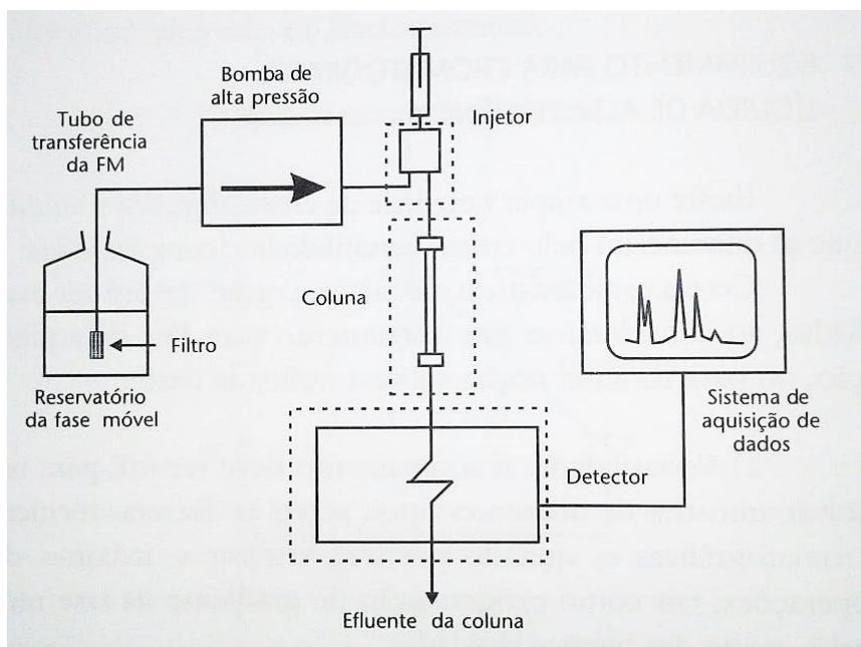


Figura 2. Esquematização simplificada de um cromatógrafo líquido. Fonte: (JARDIM et al.,2014).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou em inglês, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), é uma das técnicas que permite separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. As vantagens desta técnica incluem o tempo reduzido de análise em função da alta eficiência da coluna e a vazão rápida da fase móvel através da coluna, alta resolução e precisão, versatilidade. As limitações englobam alto custo da instrumentação, alto custo de operação e os sistemas de detecção (DIAS et al.,2016).

Na CLAE, a fase móvel utilizada deve possuir alto grau de pureza, dissolver a amostra sem decompô-la, não decompor a fase estacionária, baixa viscosidade, livre de partículas e gases. As bombas de alta pressão devem proporcionar fluxo constante e reprodutível de fase móvel para o sistema (JARDIM et al.,2014).

3.5.1 Colunas

A coluna é a unidade responsável pela separação dos componentes presentes na amostra. A análise depende diretamente da escolha da coluna, do material de recheio e das condições de operações. São constituídas de um tubo de

material inerte, capaz de resistir às pressões de trabalho, como o aço inoxidável. Nos itens apresentados na sequência são descritas as características de colunas indicadas para análises de detecção de açúcares, álcool e ácidos (JARDIM et al.,2014).

- **Coluna Aminex HPX-87P:** proporciona boa resolução para detecção de monossacarídeos, indicado para separação de derivados de celulose, análises de pentoses, hexoses, glicose, xilose, galactose, arabinose e manose. Excelente resolução para sacarose, lactose e frutose em produtos lácteos. Possui tamanho de partícula de 9 µm, atende faixa de pH de 5-9 e o tamanho da coluna possui 300 x 7,8 mm (BIO-RAD,2016).

- **Coluna Aminex HPX-87H:** coluna utilizada para análises de carboidratos encontrados em solução com ácidos carboxílicos, ácidos graxos voláteis, ácidos graxos de cadeia curta, álcoois, cetonas e diversos metabólitos neutros. Muito utilizado para análise de ácidos orgânicos, monitoramento de fermentação, análise de fluidos biológicos e separação de açúcares acetilados. É especialmente utilizada para análise de perfil de monossacarídeos e ácidos orgânicos simultaneamente. A coluna possui 300 x 7,8 mm, com tamanho de partícula de 9 µm, a faixa de pH pode variar de 1 a 3 e tamanho (BIO-RAD,2016). A Figura 3 mostra uma corrida cromatográfica utilizando a mesma coluna em detectores distintos: UV e índice de refração.

Condições:

Instrumento: GlycoChromAnalyser
Coluna: coluna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm
Amostra: Padrões de fermentação
Eluente: 5 mM ácido sulfúrico
Taxa fluxo: 0,60 ml/minuto
Temperatura: 50°C
Detecção: UV 210 nm RI

Picos:

1.Maltotriose	7.Ácido succínico
2.Maltose	8.Ácido láctico
3.Ácido cítrico	9.Glicerol
4.Ácido tartárico	10.Ácido acético
5.Glicose	11.Ácido piroglutâmico
6.Frutose	12.Metanol
	13.Etanol

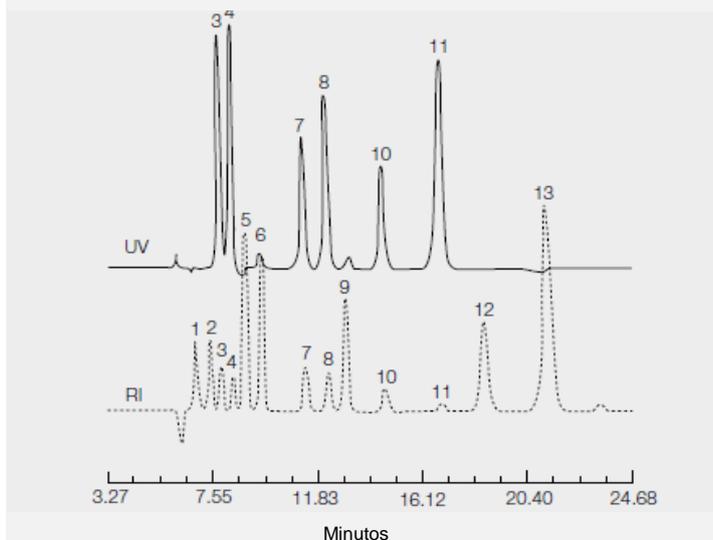


Figura 3. Uso da coluna Aminex HPX-87H para análise de um composto de fermentação em detectores UV e índice de refração. Fonte: (BIO-RAD,2016).

Na corrida cromatográfica de UV, é notável a melhoria na resolução de ácidos cítrico, tartárico, succínico, láctico e piroglutâmico, assim como o metanol e etanol. Enquanto que a detecção por índice de refração apresenta boa resolução para os açúcares, como a maltotriose, maltose, glicose, frutose (BIO-RAD,2016).

3.5.2 Detectores

É o componente de maior custo e sofisticado de um sistema cromatográfico. O funcionamento envolve de forma contínua alguma propriedade física ou físico-química da amostra e envia um sinal para registro, geralmente proporcional à concentração do componente na solução. O sinal é gerado assim que o efluente sai da coluna e chega no detector. Os detectores podem ser classificados como destrutivos e não-destrutivos. Os detectores ópticos por absorvância no ultravioleta-visível e infravermelho, por fluorescência e por índice de refração são não-destrutivos e permitem reconhecer a amostra após a análise. Os detectores destrutivos são eletroquímicos e espectrômetros de massa (JARDIM et al.,2014).

- **Detectores por absorvância no ultravioleta e no visível:** o funcionamento baseia-se na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética. Isso ocorre desde a região do UV até o infravermelho em um dado comprimento de onda (JARDIM et al.,2014).

- **Detectores por índice de refração:** detector que acompanha continuamente a diferença no índice de refração entre o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra e a fase móvel pura. Neste tipo de detector é necessário o controle de temperatura e evitar qualquer mudança na composição da mistura, pois o resultado da análise poderá ser prejudicado (JARDIM et al.,2014).

3.6 Embalagem para acondicionamento de mel

As embalagens indicadas para o acondicionamento de mel, vendidos ao varejo, são materiais como o plástico, específico para alimentos, e vidro, considerado ideal e o único material aceito para a exportação de mel de *A. mellifera* fracionado e/ou com certificação orgânica (CAMARGO et al.,2002).

Embora o vidro tenha restrições quanto ao transporte e armazenagem, é um material que possui vantagens, tais como a impermeabilidade a troca gasosa com o ambiente externo e a transparência, que permite ao consumidor a visualização da cor do produto, tornando-o mais atrativo (GOIS et al.,2013).

O tipo de tampa é um ponto vulnerável entre o produto e o ambiente externo. A vedação da tampa ocorre pela presença de um anel de vedação interno, principal vantagem em relação às embalagens plásticas, as quais podem apresentar vedação precária (CAMARGO et al.,2002;PASSAMANI,2005).

Na literatura foi encontrado um trabalho relacionado à utilização de diferentes embalagens, descritos a seguir. No estudo do armazenamento de méis de abelhas africanizadas durante 6 meses, foram avaliadas três embalagens: polietileno (plástico branco e opaco), polietileno coberto com papel adesivo preto e vidro translúcido em três condições: com exposição e abrigo da luz. Concluiu-se que embalagem armazenada ao abrigo da luz contribuiu para desacelerar o aumento da taxa de hidroximetilfurfural e a incidência da luz juntamente com o armazenamento em temperaturas elevadas são fatores determinantes nas alterações na atividade diastásica (MELO et al.,2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matéria-prima: Mel de abelhas sem ferrão

A amostra de mel de abelha sem ferrão utilizada nos experimentos é proveniente da espécie *Melipona mondury*, abelha nativa de formações relativamente úmidas da Mata Atlântica dos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. É conhecida popularmente como Uruçu-amarela, “bugia” no Paraná e “Tujuba” em Santa Catarina.

O lote de 13,5 kg de mel de *M. mondury*, cedido por intermédio de Jerônimo Villas-Bôas, foi coletado em março de 2015 pelos índios Tupiniquim e Guarani, que habitam terras indígenas na zona costeira do município de Aracruz, Espírito Santo. O mel foi extraído de um meliponário localizado na região de Aracruz, nas coordenadas 381757X e 7804390Y (UTM). Foi utilizada uma bomba de sucção modelo cirúrgico para a colheita do mel, o qual foi filtrado imediatamente em uma peneira de inox e armazenado em um recipiente de polietileno. O lote foi refrigerado logo após o envase.

O transporte foi realizado através de uma transportadora, à temperatura ambiente. O mel foi armazenado em um recipiente de polietileno e mantido mantido sob-refrigeração à $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara fria até o processamento do lote na Planta Piloto do Grupo de Engenharia de Processos (GEPC).

4.1.2 Equipamentos para processamento

Serão apresentados nos próximos itens as especificações de embalagem para a amostra, sistema de pasteurização e refrigeração, bem como o sistema de aquisição de dados de temperatura utilizado para a avaliação do tratamento térmico aplicado.

- **Embalagem:** o envase do mel foi realizado em frascos de vidro fabricados pela Vidraria Anchieta, com dimensões de 46 mm de altura e 34 mm de diâmetro, com tampa metálica rosqueável e capacidade para 40 ml;

- **Tanque de pasteurização:** foi utilizado um tanque de inox de dimensões 0,62 m x 0,88 m x 0,51 m e capacidade aproximada de 200 litros. É munido de resistências elétricas para aquecimento da água, que é agitada por meio de ar comprimido

inserido por dois tubos perfurados localizados ao longo do comprimento do tanque. As amostras de méis foram acondicionados em seus dois cestos de inox de dimensões: 0,50 m x 0,22 m x 0,36 m perfurados nas laterais e no fundo;

- **Banho ultratermostatizado:** equipamento utilizado para realização de testes de definição do ponto de aquecimento mais lento da embalagem e estabilização de temperatura da amostra durante a análise de densidade. Fabricado pela empresa Marconi, modelo MA-184, nº série 05151321, possui estrutura em ferro laminado com dimensões externas de largura: 32 cm, profundidade 51 cm e altura 50 cm; dimensões internas da cuba de largura 25 cm, profundidade 38 cm e altura 19 cm e volume útil total de 8 litros. O controle de temperatura é efetuado por um controlador PID, marca Novus, com incerteza de 0,11°C e faixa de indicação de trabalho de 5°C a 90°C.

- **Sistema de aquisição de temperatura:** As aquisições de temperatura dos ensaios de distribuição de temperatura e penetração de calor foram realizadas utilizando o sistema E-Val Flex, com 16 termopares de agulhas tipo T, acoplados a um aquisitor de dados modelo M16 Serial nº 14631, com 16 canais, operado pelo software E-ValSuite Pro 2.8.5.0v ELLAB A/S, Krondalvej 9, DK-2610. O histórico de temperatura foi adquirido por meio do coletor E-Val Flex acoplado a um notebook marca Dell. A taxa de aquisição programada para os termopares foi de 3 segundos;

- **Sistema de refrigeração:** as amostras foram armazenadas e mantidas a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ em câmara fria, fabricante Danfoss, com um controlador de temperatura digital Full Gauge modelo AHC-80 plus. Foi realizada uma checagem diária da temperatura da câmara fria através de anotações em planilhas de controle, durante o período de um ano.

4.1.3 Análise estatística

O *software* Statistica 13.1 foi a ferramenta utilizada para auxiliar o tratamento dos dados obtidos nas análises físico-químicas (pH, atividade de água, acidez livre, umidade e sólidos totais) (STATSOFT,2016). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As médias de cada teste foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi aplicado para verificar diferenças entre as médias, sendo que, diferenças ao nível de 95% ($p < 0.05$) foram consideradas estatisticamente significantes. Serão apresentados também gráficos tipo “boxplot” para a comparação dos resultados

obtidos em cada tratamento ao longo do tempo de armazenamento em função da análise físico-química, assim como os respectivos desvios padrões. O gráfico mostrará a média (no formato de um pequeno quadrado) rodeado por um retângulo (\pm desvio padrão(DP)). Para uma distribuição normal, os marcadores representam um intervalo de confiança de 95% definido como a média variável $\pm 1,96$ vezes o desvio padrão variável (STATSOFT,2016).

4.2 Métodos

4.2.1 Metodologias de análises físico-químicas e microbiológicas

As amostras de méis foram analisadas no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), localizado em Campinas-SP, de acordo com a capacidade analítica de cada laboratório, descrito a seguir:

- Laboratório do Grupo de Engenharia de Processos (GEPC): acidez livre (meq/kg), densidade relativa e absoluta (kg/m^3), pH, teor de sólidos solúveis (%), umidade (%);
- Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolates (CHOCOTEC): atividade de água;
- Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA): *Salmonella*, Coliformes Termotolerantes, Contagem Total de Aeróbios Mesófilos, Contagem de Bolores e Leveduras e Contagem de Leveduras Osmofílicas.

A determinação de ácidos (acético, láctico), carboidratos (frutose, glicose e sacarose), HMF (por HPLC), etanol foram realizados no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), localizado em Campinas-SP.

A Tabela 5 mostra a periodicidade de realização de cada análise supracitada e a seguir são detalhados os respectivos métodos de análises.

Tabela 5. Cronograma de análises físico-químicas e microbiológicas ao longo de um ano de acompanhamento das amostras.

Ano	2015										2016			
Tempo (meses)	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tempo (dias)	0	15	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Data de execução da análise	30/03	24/04	09/05	08/06	08/07	07/08	06/09	06/10	05/11	05/12	04/01	03/02	04/03	03/04
	Quantidade de amostra para análise (frasco)													
Densidade relativa	1													
Sólidos solúveis	1	4		4		4		4		4		4		4
pH	1	4		4		4		4		4		4		4
Acidez livre	1	4		4		4		4		4		4		4
Atividade de água	1	4		4		4		4		4		4		4
Bolores e leveduras	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Leveduras osmofílicas	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Coliformes termotolerantes	1													4
Contagem total de aeróbios mesófilos		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Salmonella	1					4								4
HMF (CCQA, ITAL)	1					4								4
HPLC	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

O número “1” refere-se a análise realizada no lote de mel antes do processamento. O número “4” representa que a análise foi realizada em amostras dos 4 testes nos quais o mel foi submetido, detalhados na Tabela 7 do item 4.2.3.

4.2.1.1 Determinação de acidez livre (meq/kg)

O método de acidez livre foi determinado pelo método titrimétrico, conforme descrição a seguir (AOAC,2010).

Dez gramas de mel foram diluídos em 75 ml de água destilada livre de CO₂. Antes de iniciar a análise, foi feita a leitura do pH. A amostra foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 N em um fluxo de 5 ml por minuto. Quando a solução atingiu o pH de 8,5, a titulação foi interrompida. Para o cálculo da acidez livre foi utilizada a Equação 6.

$$\text{Acidez livre} = (\text{mL NaOH } 0,05\text{N utilizados na bureta}) - \text{mL branco}) \times 50 \quad (6)$$

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

De acordo com a Instrução Normativa nº11 de 20 de outubro de 2000, o máximo permitido são 50 miliequivalentes/kg para mel proveniente de *A. mellifera* (BRASIL,2000).

4.2.1.2 Determinação de umidade (%)

A determinação de umidade foi realizada pelo método refratométrico em um refratômetro portátil modelo 60-90 (Atago), na temperatura de 20°C (AOAC,2010).

Dois gramas de amostra foram colocados no dispositivo refrator do instrumento, o qual foi fechado e após o ajuste ao ângulo, a leitura foi realizada em uma escala que expressa diretamente o valor em graus Brix (°Brix) ou pode ser expresso em porcentagem (%). O cálculo da umidade é realizado pela subtração do valor em graus Brix do valor de 100. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

4.2.1.3 Determinação de sólidos solúveis (%)

Consiste em um método físico para a medição da quantidade de sólidos solúveis presentes em uma amostra. É baseado em um sistema de graduação especialmente utilizado pela indústria açucareira, em análises de açúcares em geral que estejam em solução (SILVA,2003).

A análise de sólidos solúveis foi realizada pelo método refratométrico em um refratômetro portátil modelo 60-90 (Atago), na temperatura de 20°C (AOAC,2010).

Dois gramas de amostra foram inseridos no dispositivo refrator do instrumento o qual foi fechado e após o ajuste ao ângulo, a leitura foi realizada em

uma escala que expressa diretamente o valor em graus Brix ($^{\circ}$ Brix) ou pode ser expresso em porcentagem (%). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão.

4.2.1.4 Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada pelo método potenciométrico. Foram utilizados 5 g de mel para a leitura do pH diretamente na amostra. Para calibração do pHmetro modelo PG2000 (Gehaka), foram utilizadas as soluções tampão 4,01 e 7,00, ambos da marca Merck. Após a calibração do equipamento, foi feita a lavagem do eletrodo com água destilada. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão (BOGDANOV,2002).

4.2.1.5 Determinação de atividade de água (a_w)

De acordo com o laboratório responsável, as análises de atividade de água foram realizadas em um analisador de a_w por ponto de orvalho (Dewpoint water activity meter), modelo 4TEV Aqualab, fabricado pela Decagon. As análises foram realizadas em triplicata, na temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, de acordo com as instruções do fabricante do equipamento conforme descrito na sequência.

Cinco gramas de amostra foram inseridas em uma cápsula de plástico, o qual foi introduzido no analisador de a_w e a tampa do equipamento foi fechada para estabilização e leitura do resultado (DECAGON,2016). Os valores de atividade de água e temperatura foram anotados por um analista. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

O equipamento funciona com um mecanismo denominado “ponto de orvalho”, que é a razão entre a pressão de vapor da amostra e a pressão de vapor da água pura. Um feixe infravermelho focado em um espelho determina a temperatura precisa no ponto de orvalho da amostra. A partir da relação entre as pressões de valor o analisador fornece a quantidade de água livre na amostra do mel analisado. As especificações do analisador de a_w compreendem: faixa de leitura de 0,030 a 1,00 a_w e resolução de $\pm 0,003$ (DECAGON,2016).

4.2.1.6 Determinação densidade relativa e absoluta

As análises foram conduzidas em triplicata, de acordo com a metodologia de análise de densidade relativa (AOAC,2006). Foi utilizado picnômetro de vidro, na temperatura de 25°C , em banho termostático modelo MA-184 (Marconi). Os

picnômetros foram aferidos, pesando-os vazios com tampa. Após, os mesmos foram preenchidos com água destilada, tampados e mantidos em banho termostático a 25°C até estabilização da temperatura, procedendo em seguida a pesagem em balança analítica modelo ADA 210 I (Adam Equipment). Os picnômetros foram preenchidos com a amostra, colocados em banho termostático para estabilização da temperatura de análise e foram submetidos novamente à pesagem. Foram calculados a densidade relativa e densidade absoluta de acordo com as equações 7 e 8.

$$d = \frac{m_{am}}{m_{ag}} \quad (7)$$

$$\rho_{am} = d \cdot \rho_{ag} \quad (8)$$

Sendo:

d = densidade relativa (adimensional);

m_{am} = massa da amostra na temperatura de análise (kg);

m_{ag} = massa da água na temperatura de análise (kg);

ρ_{am} = Densidade absoluta da amostra na temperatura do ensaio (kg/m³);

ρ_{ag} = Densidade absoluta da água na temperatura do ensaio na temperatura do ensaio (kg/m³).

4.2.1.7 Determinação de ácidos, açúcares e etanol por HPLC

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Segundo o laboratório executor das análises (CTBe), as amostras foram diluídas 100x para a quantificação dos teores de frutose e glicose; diluídas em 10x para a quantificação dos valores de sacarose. Os valores de álcoois e ácidos orgânicos foram obtidos pela injeção das amostras sem diluição. As análises foram realizadas em unicata.

Ainda conforme procedimento realizado, as amostras foram acondicionadas em temperatura ambiente por alguns minutos e homogeneizadas em agitador vórtex durante aproximadamente 30 segundos. Em seguida, as amostras foram diluídas em água ultrapura obtida de um sistema Millipore Milli-Q® System. A solução da amostra foi agitada em vórtex e filtrada em filtro de seringa com membrana de 0,45 µm para vial cromatográfico. A quantificação foi feita com operação externa.

- **Determinação de ácidos acético, láctico e etanol:** a separação dos analitos foi realizada em uma coluna H, Aminex HPX-87H (Bio Rad), com dimensões de 300 mm x 7,8 mm, com partículas de 9 micras (μm), arranjo de pré colunas H e IG (Bio Rad), na temperatura de 35°C. Segundo a metodologia adotada pelo laboratório CTBe, o volume de injeção de 10 μL de amostra foi introduzido em um fluxo de 0,6 ml/minuto e os analitos foram identificados através de um detector de índice de refração, à 35°C, em um tempo de corrida de 30 minutos. Foi utilizado ácido sulfúrico 0,005M como solvente da fase móvel.

- **Determinação de açúcares (frutose, glicose e sacarose):** a separação dos carboidratos foi realizada em coluna P, Aminex HPX-87P (Bio Rad), com dimensões de 300 mm x 7,8 mm, com partículas de 9 micras (μm), arranjo de pré-colunas Carb P e IG (Bio Rad), na temperatura de 55°C. Segundo metodologia adotada pelo CTBe, o volume de injeção de 10 μL de amostra foi introduzido em um fluxo de 0,5 ml/minuto e os analitos foram identificados através de um detector de índice de refração, à 50°C, em um tempo de corrida de 30 minutos. A água ultrapura, obtida de um sistema Millipore Milli-Q System foi utilizado como solvente da fase móvel.

- **Determinação de açúcares redutores totais:** a partir dos teores de sacarose, frutose e glicose, obtidos por análise cromatográfica, foi possível determinar o ART (açúcares redutores totais, g/100 g) contidos no mel, de acordo com a Equação 9.

$$ART \text{ (açúcares redutores totais)} = \frac{\text{sacarose}}{0,95} + \text{frutose} + \text{glicose} \quad (9)$$

4.2.1.8 Determinação de hidroximetilfurfural (HMF)

A determinação de HMF por espectrofotometria foi realizada na recepção da amostra de mel e nos meses subsequentes, a análise foi realizada utilizando o HPLC.

O teor de HMF por espectrofotometria foi analisado de acordo com a (AOAC,2010). Segundo procedimentos descritos pelo laboratório responsável pela execução desta análise (CCQA-ITAL), cinco gramas de mel foram dissolvidos em 25 ml de água, transferido quantitativamente em um balão volumétrico de 50 ml. Foram adicionados e misturados 0,5 ml de solução de Carrez I e 0,5 ml de solução de Carrez II e água para completar o volume. A solução foi filtrada e foram rejeitados os primeiros 10 ml de líquido filtrado. Alíquotas de 5 ml foram colocadas em tubos testes; em um tubo foram adicionados 5 ml de água destilada (amostra em solução)

e no segundo tubo foram adicionados 5 ml de bissulfito de sódio 0,2% (solução de referência). A solução foi misturada e homogeneizada. A absorbância das soluções foi determinada a 284 nm e 336 nm em cubetas de 1 cm utilizando um espectrofotômetro UV-visível (modelo Varian Cary 50 Scan, Varian, Inc). A quantificação do teor de HMF foi calculado utilizando a Equação 10.

$$\frac{mg\ HMF}{100\ g\ de\ mel} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 14,97 \times 5}{g\ amostra\ teste} \quad (10)$$

$$Fator = 14,97 = \left(\frac{126}{16830}\right) * \left(\frac{1000}{16830100}\right) * \left(\frac{100}{5}\right)$$

Sendo:

- peso molecular HMF = 126;
- molar α HMF a 284 nm = 16830; mg/g = 1000; centilitros/L = 10;
- g de mel reportado = 100;
- peso de porção nominal teste = 5.

A análise de HMF realizada no laboratório CTBe utilizou a metodologia de determinação por HPLC. As amostras foram injetadas sem diluição, filtrados por um filtro de 0,45 μ m e imediatamente injetado em um cromatógrafo modelo ultimate 3000 (Dionex), equipado com um detector UV visível modelo ultimate 3000 RS (Dionex), operado em 274 nm. Foi utilizada a coluna C18, modelo 059 133 (Dionex), com dimensões de 150 mm x 4,6 mm e partículas de 3 micras (μ m). Foram utilizadas as condições: volume de injeção de amostra de 10 μ L, fluxo de 0,8 μ L/minuto, a coluna foi operada em temperatura ambiente (25°C) em um tempo de corrida de 20 minutos. Foram utilizados na fase móvel água e acetonitrila na proporção 8:1 com 1% de ácido acético v/v. Foram utilizados solventes grau HPLC em todas as análises.

4.2.1.9 *Salmonella* spp.

A análise de *Salmonella* spp. foi realizada no recebimento da amostra de mel de *M. mondury*, após 180 e 360 dias em todos os testes. De acordo com o laboratório responsável pela análise, foi seguida a metodologia prescrita em ISO 6759, que consiste nas etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e seleção, descritas a seguir (AOAC,2012;ISO,2007).

Na etapa de pré-enriquecimento foram homogeneizados 25 g de amostra em 225 ml de água peptonada tamponada (BPW) incubando-se a 37°C por 18 horas.

Uma porção de 25g foi pré-enriquecida com 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW), e incubada por 18 ± 2 h à 37°C . O segundo pré-enriquecimento foi realizado adicionando 10 μL da amostra pré-enriquecida em 500 μL de Infusão Cérebro Coração (BHI). Os tubos foram incubados por 3 horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Em seguida foram transferidos 5 μL de cada amostra enriquecida para os tubos de lise. Após a transferência seguiu-se para a reação de lise. Nesta etapa os tubos foram aquecidos à $37^{\circ}\text{C}\pm 2\text{C}$ por 20 minutos e, em seguida a $95^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Após esta fase os tubos foram mantidos por 5 minutos em um bloco de resfriamento, enquanto foi preparada a transferência das amostras para os tubos de PCR.

Após esta etapa foi colocado um tubo de PCR por amostra em um suporte contendo o tablete de reação essencial à análise, em seguida os mesmos foram hidratados com 50 μL da amostra lisada e resfriada. Em seguida, o bloco de resfriamento foi levado para o termociclador para a etapa de amplificação. O programa de processo completo de ciclagem e detecção levou cerca de três horas e meia. Os resultados foram visualizados no programa, considerando verde o resultado negativo e vermelho o positivo para *Salmonella*.

4.2.1.10 Coliformes termotolerantes

A determinação de coliformes termotolerantes foi realizada no recebimento da amostra de mel, após 180 e 360 dias em todos os tratamentos. Conforme laboratório responsável pela análise, a metodologia utilizada seguem os preceitos da ISO 7251, o qual aborda o método do NMP (Número mais Provável), que inclui as etapas: teste presuntivo, contagem de coliformes totais e termotolerantes e confirmação de *E. coli*, descritas na sequência (ISO,2005).

Três alíquotas de três diluições de amostra foram inoculadas em três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) à 35°C por 24 a 48 horas. A produção de gás pela fermentação da lactose contida no meio, em tubos de Durhan invertidos, é considerado suspeito (presuntivo) para a presença de coliformes. Para confirmar a presença de coliformes totais e termotolerantes, foi transferida uma alçada de cada tubo suspeito para tubos com Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e Caldo *E. coli* (EC), os quais são meios seletivos que contém lactose. Os resultados foram expressos em NMP/g (número mais provável por grama).

A presença de gás após a incubação à 35°C durante 24-48 h nos tubos de VB é considerada positiva para presença de coliformes totais. Se a presença de gás for observada em tubos de EC incubados à 45,5°C após 24 h, é considerada confirmativa a presença de coliformes termotolerantes.

Caso os tubos de EC sejam positivos, é considerada suspeita a presença de *E. coli*. Para tal confirmação, uma alçada deve ser estriada em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB), o qual é um meio seletivo diferencial para a distinção entre *E. coli* e os demais termotolerantes. Caso haja desenvolvimento de colônias de *E. coli* no L-EMB, duas colônias devem ser isoladas para as provas bioquímicas de indol, VM, VP e citrato (IMViC).

4.2.1.11 Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)

O método de contagem total de aeróbios mesófilos em placas ou do inglês, *Aerobic Plate Count*, também é denominado Contagem Padrão em Placas. Esta análise foi realizada mensalmente em todos os testes aplicados no mel de *M. mondury*. Segundo o laboratório responsável, o método utilizado foi seguido de acordo com a literatura (SILVA et al.,2010); (DOWNES,ITO,2001).

Foram homogeneizados 25 g de amostra em 225 ml de água peptonada. Desta solução (10^1) foi retirada uma alíquota de 1 ml para ser esgotado em um tubo contendo 9 ml de água peptonada (10^2). Deste tubo, foi retirado 1 ml para ser pipetado em outro tubo (10^3) com 9 ml de água peptonada. Após preparo dos tubos (10^1 , 10^2 e 10^3), foram pipetados e inoculados 0,1 ml de cada diluição em placas previamente preparadas e secas contendo PCA (Ágar Padrão para Contagem) para plaqueamento em profundidade. As placas de petri foram invertidas e incubadas a $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Para a contagem das colônias e cálculos dos resultados, foram selecionadas e contadas as placas com 25 a 250 colônias com auxílio de uma lupa em um contador de colônias. O cálculo do número de unidades formadoras de colônias (UFC)/g foi realizado multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada.

Os resultados foram expressos em notação exponencial e apenas uma casa decimal após a vírgula.

4.2.1.12 Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)

A contagem de bolores e leveduras foi realizada mensalmente em todos os tratamentos aplicados no mel de *M. mondury*. De acordo com o laboratório responsável, a análise foi realizada de acordo com (DOWNES, ITO, 2001; SILVA et al., 2010).

O método consiste na quantificação de bolores e leveduras realizado pelo método de contagem padrão em placas, em que é quantificado o número de unidades formadoras de colônias (UFC). O plaqueamento em superfície é indicado para aumentar a exposição ao oxigênio e evita o estresse promovido pelo meio de cultura quente, conforme metodologia descrita a seguir.

Foram homogeneizados 25 g de amostra em 225 ml de água peptonada, desta solução (10^1) foi retirado 1 ml para ser pipetado em um tubo contendo 9 ml de água peptonada (10^2) e deste tubo, foi retirado 1 ml para ser pipetado em outro tubo (10^3) com 9 ml de água peptonada.

Após preparo dos tubos (10^1 , 10^2 e 10^3), foram pipetados e inoculados 0,1 ml de cada diluição em placas previamente preparadas e secas contendo DG-18 (Ágar Dicloran Glicerol 18), indicado para alimentos com a_w menor ou igual a 0,95, exceto para produtos lácteos. Esse procedimento foi realizado para o plaqueamento em superfície. As placas de petri foram incubadas (sem inverter) a 22-25°C durante cinco dias.

Para a interpretação dos resultados foi analisada a presença de colônias típicas de bolores, seguido de sua quantificação em UFC/g e para leveduras, foram pesquisadas colônias presuntivas, seguido de uma observação microscópica da morfologia das células e quantificação de acordo com a porcentagem de colônias confirmadas. Ao final foi realizada a somatória dos resultados de bolores e leveduras em UFC/g.

4.2.1.13 Contagem de leveduras osmofílicas (UFC/g)

A contagem de leveduras osmofílicas foi realizada mensalmente em todos os testes realizados no mel de *M. mondury*. De acordo com o laboratório responsável, a análise foi realizada segundo metodologia presente na literatura, detalhado a seguir (DOWNES, ITO, 2001; SILVA et al., 2010).

Foram homogeneizados 25 g de amostra em 225 ml de Tampão Fosfato pH 7,2 suplementado com 40% de glicose (peso/peso) (diluição 10^{-1}). As diluições subsequentes foram preparadas utilizando o mesmo diluente. Foi inoculado 1 ml da amostra sem diluição, 1 ml da diluição 10^{-1} e 1 ml do tubo 10^{-2} em placas de petri estéreis. Foram adicionados também 20 ml de Ágar Extrato de Malte Extrato de Levedura 40% Glicose (MY40G). As placas foram incubadas a 30°C por cinco a sete dias. As colônias foram quantificadas com auxílio de uma lupa de um contador de colônias. Ao final foi realizada a somatória dos resultados de leveduras em UFC/g.

4.2.2 Avaliação preliminar ao processo de pasteurização

Na avaliação preliminar ao processo de pasteurização, foram realizados ensaios de distribuição de temperatura no tanque de pasteurização e ensaios para a definição da localização da região de aquecimento mais lento das embalagens contendo mel.

Foram realizados dois testes, sendo o primeiro no tanque de pasteurização e o segundo no banho termostático Marconi, cujas especificações foram descritas no item 4.1.2.

Os ensaios de distribuição de temperatura são necessários para verificar a existência de uma região de aquecimento mais lento do equipamento (YANNIOTIS,SUNDÉN,2007). Em processos térmicos realizados em autoclaves esta região é a última área do equipamento a atingir a temperatura de processamento mínima (IFTPS,2014). Para autoclaves a metodologia utilizada para a execução de estudos de distribuição de temperatura e de penetração de calor seguem os protocolos do IFTPS (*Institute of Food Thermal Process Specialists*) (IFTPS,2014).

De acordo com essas normas, os ensaios de distribuição de temperatura em autoclaves devem conter um termopar posicionado próximo ao controlador/registrador do equipamento e 5 termopares por cesto/carrinho. Para os ensaios de penetração de calor é requerido 10 embalagens instrumentadas com sensores de temperatura posicionados na região de aquecimento mais lento das mesmas, que deverão estar posicionadas na região de aquecimento mais lento da autoclave. Em ambos os testes, o equipamento deve ser carregado com carga máxima, sendo que nos testes de distribuição de temperatura em autoclaves a vapor, é permitido o uso embalagens envasadas com água.

Como não há protocolos específicos para a execução de estudos de distribuição de temperatura e penetração de calor em processos de pasteurização, os ensaios foram conduzidos baseado nas normas IFTPS (2014) com readequações quanto ao número de pontos de aquisição de temperatura, em função da menor dimensão do tanque de pasteurização utilizado, quando comparado a autoclaves industriais.

4.2.2.1 Ensaio 1 realizado no tanque de pasteurização

O primeiro ensaio teve como objetivo definir a existência e a localização de uma região de aquecimento mais lento no tanque de pasteurização e em paralelo, definir a região de aquecimento mais lento no interior da embalagem de mel.

No tanque de pasteurização foram distribuídos 192 frascos: 96 em cada um dos dois cestos, dos quais 93 unidades foram preenchidas com 35 g de água e 3 unidades com 35 g de mel de *A. mellifera* (marca Florismel, envasado em 14/10/13, validade: 14/10/15). Os frascos foram distribuídos em duas camadas contendo 48 frascos, conforme Figura 4.

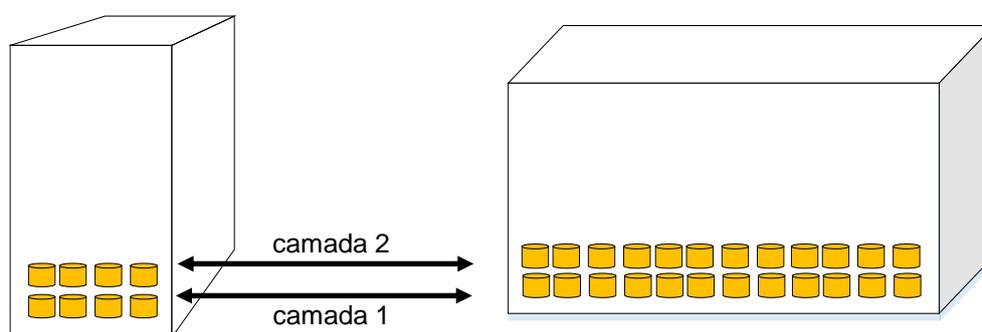


Figura 4. Distribuição de frascos de acordo com as vistas frontal (à esquerda) e lateral (à direita) de um cesto do tanque de pasteurização utilizado no ensaio de distribuição de temperatura.

Foram posicionados no tanque de pasteurização 14 termopares tipo T, oito deles foram utilizados para a aquisição da temperatura do tanque de pasteurização, os outros 6 termopares foram inseridos nos frascos contendo mel para o registro das temperaturas iniciais e determinação da região de aquecimento mais lento na embalagem, conforme Figura 5.



Figura 5. Esquematização de frascos em tanque de pasteurização no ensaio 1 de distribuição de temperatura.

Na Tabela 6 estão identificadas as localizações dos termopares utilizados no ensaio 1 de distribuição de temperatura no tanque de pasteurização.

Tabela 6. Relação de termopares distribuídos no tanque de pasteurização e nos frascos contendo mel no ensaio de distribuição de temperatura.

Monitoramento	Sensor	Localização (vista frontal do tanque)	Cesto	Camada
Meio de Aquecimento (TA)	25249	Lateral direita, 15 cm da base do cesto	1	1
	25236	Lateral direita, 10 cm da base do cesto	1	2
	25238	Lateral esquerda, 15 cm da base do cesto	1	2
	25235	Lateral esquerda, 10 cm da base do cesto	1	1
	25246	Próximo à resistência elétrica	-	-
	25244	Lateral esquerda, 10 cm da base do cesto	2	2
	25243	Lateral direita, 15 cm da base do cesto	2	1
	25251	Lateral direita, 10 cm da base do cesto	2	2

Monitoramento	Sensor	Comprimento poço (mm)	Cesto	Camada	Frasco nº
Produto	25253	35	2	1	1
	25247	35	2	2	2
	25245	35	1	1	3
	25250	35	1	2	4
	25241	40	2	2	5
	25242	40	1	1	6

Para o monitoramento das temperaturas nos frascos com mel foi necessário perfurar as tampas metálicas no eixo central da embalagem para a inserção dos poços (peças que permitem a inserção da agulha do termopar no interior do frasco). Na haste do termopar foram inseridos espaçadores (space bars) de forma a proteger parte da agulha não inserida no poço. Na parte interna e externa do orifício da tampa, um *o-ring* foi inserido, permitindo a vedação do encaixe dos poços de comprimento de 35 mm e 40 mm, conforme Figura 6.



Figura 6. Montagem de espaçadores, poços de 35 mm (à esquerda) e 40 mm (à direita).

Ambos os poços permitiram o posicionamento dos termopares em duas alturas distintas, a 13 cm e 8 cm respectivamente, medidos a partir da base do frasco de vidro, conforme Figura 7. As extremidades dos termopares, local onde a temperatura foi adquirida, ficaram posicionadas no centro radial da embalagem.



Figura 7. Instrumentação de tampas com poços para introdução de termopar (à esquerda) e frascos com poços de 40 mm e 35 mm.

4.2.2.2 Ensaio 2: conduzido no banho termostático

Um segundo ensaio foi realizado com o objetivo de confirmar a utilização de um poço mais adequado para a realização do ensaio de penetração de calor no mel.

Como esta definição não foi conclusiva no ensaio anterior, o ensaio 2 foi conduzido no banho termostático para a confirmação da região de aquecimento mais lento da embalagem contendo o mel de *M. mondury*.

Oito pontos distintos foram monitorados, sendo que 2 termopares realizaram a aquisição das temperaturas do meio de aquecimento (banho termostático) e 6 termopares no interior dos frascos contendo o mel de *M. mondury* descrito no item 4.1.1, conforme Figura 8. A instrumentação das tampas metálicas foi realizada de acordo com o ensaio 1.

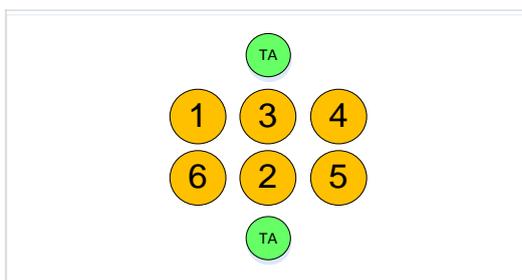


Figura 8. Posicionamento dos frascos no banho (vista superior).

Na Tabela 7 estão listados os termopares e seus respectivos locais de aquisição de temperatura no banho, assim como os comprimentos dos poços utilizados nos frascos instrumentados. A instrumentação foi realizada de acordo com o ensaio anterior onde o comprimento dos poços de 35 e 40 mm permitiram a aquisição de temperatura no eixo radial a 13 cm e a 8 cm, respectivamente, medidos a partir da base do frasco de vidro.

Tabela 7. Distribuição de termopares ao longo do tanque de pasteurização e nos frascos.

Monitoramento	Termopar	Localização
Meio de aquecimento	TA-25235	Região central do banho, ao lado do frasco 3
	TA-25236	Região central do banho, ao lado do frasco 2

Monitoramento	Termopar	Comprimento poço (mm)	Frasco
Produto	25238	40	1
	25241	40	2
	25242	35	3
	25247	35	4
	25249	40	5
	25250	35	6

4.2.3 Tecnologias de conservação: metodologias aplicadas ao mel de *M. mondury*

Devido à restrita quantidade de mel fornecido e a necessidade de acompanhamento das amostras por um período de um ano, o lote foi dividido em quatro partes iguais, T01 a T04, que por sua vez foram tratadas e armazenadas conforme descreve a Tabela 8.

Tabela 8. Descrição dos métodos aplicados em mel de *M. mondury*.

Teste	Descrição
T01	Amostras pasteurizadas, mantidas à temperatura ambiente (25°C)
T02	Amostras pasteurizadas, mantidas sob-refrigeração (5°C± 2°C)
T03	Amostras sem pasteurização, mantidas à temperatura ambiente (25°C)
T04	Amostras sem pasteurização, mantidas sob-refrigeração (5°C± 2°C)

O fracionamento foi realizado nas embalagens de 40 ml previamente higienizadas, imersas em água em ebulição por 10 minutos (TORTORA et al.,2009).

Foram pesados 35 gramas de mel de *M. mondury* em cada frasco totalizando 96 frascos para cada teste (T01 a T04). Esses frascos (Figura 9) foram acondicionados em caixa de papelão ondulado, que preveniu a incidência de luz no produto. Em cada caixa de papelão foram armazenados 96 frascos de mel, empilhados em duas camadas de 48 frascos.



Figura 9. Frascos de vidro com mel de *M. mondury*.

A seguir são descritos o processo de pasteurização aplicado e as condições de armazenamento das amostras.

4.2.3.1 Processo de pasteurização

Nesta etapa foi realizado o tratamento térmico de pasteurização nas amostras referentes aos testes T01 e T02, considerando os resultados obtidos nos ensaios preliminares (1 e 2, abordados no item 4.2.2) de avaliação de distribuição de

temperatura do tanque de pasteurização e ensaio para a definição da região de aquecimento mais lento no interior da embalagem.

Neste processo, foram realizados os cálculos de penetração de calor nas amostras T01 e T02 para determinar a intensidade do tratamento térmico (valor P), utilizando os históricos de temperatura do produto e os parâmetros de resistência térmica dos micro-organismos alvos da pasteurização. A letalidade é a soma do efeito letal de cada combinação tempo/temperatura por que passa o produto, determinado através do valor z (SILVA et al.,2010).

A configuração de carregamento do tanque foi igual à realizada no estudo de distribuição de temperatura do tanque de pasteurização. Foram distribuídos 48 frascos em cada uma das duas camadas (1, inferior e 2, superior) de cada cesto, totalizando 96 amostras por cesto, conforme Figura 4.

O monitoramento e a aquisição das temperaturas foram realizados em 16 pontos distintos, sendo: 8 termopares para a aquisição das temperaturas do meio de aquecimento (tanque de pasteurização) e 8 termopares no interior dos frascos contendo mel de *M. mondury*, de acordo com a Figura 10.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio 2, preliminar ao processo de pasteurização, que serão discutidos adiante, os frascos foram instrumentados com poços de 40 mm. A partir dos históricos de temperatura adquiridos durante a pasteurização do mel, foram coletados os valores de letalidade térmica (valor P).

A distribuição de termopares no tanque de pasteurização e frascos de mel é apresentada na Tabela 9 e Figura 10.

Tabela 9. Distribuição de termopares no tanque de pasteurização e frascos de mel.

	Sensor	Localização	Cesto	Camada	Frasco nº
Meio de aquecimento	25235	Temperatura água do tanque (distribuidor ar comprimido)	-	-	-
	25236	Próximo à resistência elétrica	-	-	-
	25251	Lado esquerdo do cesto (abaixo)	1	-	-
	25238	Lado direito do cesto (abaixo)	1	-	-
	28375	Lado direito do cesto (abaixo)	2	-	-
	25240	Lado esquerdo do cesto (acima)	1	-	-
	25241	Lado esquerdo do cesto (acima)	2	-	-
	25242	Lado direito do cesto (acima)	2	-	-
	Produto	25243	Teste T01	1	1
25244		Teste T02	1	1	2
25245		Teste T01	1	2	3
25246		Teste T02	1	2	4
25247		Teste T01	2	1	5
25253		Teste T02	2	1	6
25249		Teste T01	2	2	7
25250		Teste T02	2	2	8

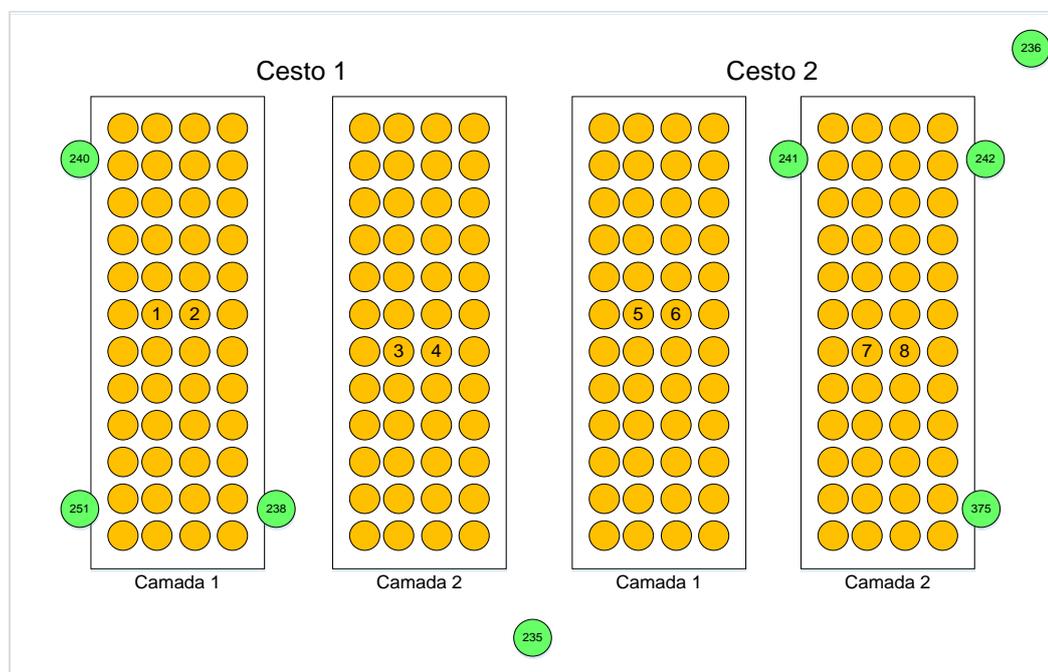


Figura 10. Distribuição de termopares no tanque de pasteurização no ensaio de penetração de calor.

Nas figuras 11 e 12 é possível visualizar a distribuição de termopares nos cestos. Após a pasteurização, os frascos referentes ao T01 foram devidamente

armazenados à temperatura ambiente e os frascos do T02 foram armazenados em câmara fria.



Figura 11. Instrumentação dos frascos para a aquisição das temperaturas (cesto 1, à esquerda e cesto 2, à direita).

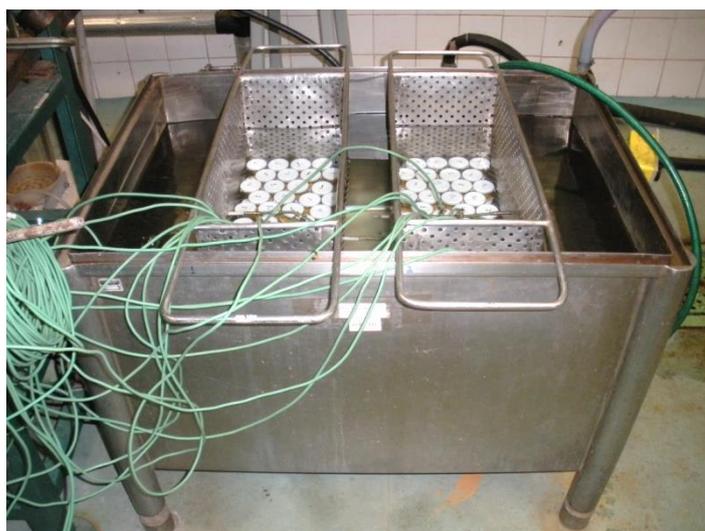


Figura 12. Instrumentação do tanque de pasteurização.

4.2.3.1.1 Critérios utilizados no Processo de Pasteurização

Devido à faixa de valores de atividade de água reportados em mel de abelhas sem ferrão (0,60 a 0,80), esse produto não apresenta condições para o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *Salmonella*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Este último, dentre os patógenos é o que se desenvolve em menor atividade de água, de 0,85 (BLACK E BARACH, 2015), que é portanto, um valor ainda acima da faixa de a_w deste mel.

Diante disso, o objetivo da pasteurização realizada teve como alvo microorganismos deteriorantes capazes de se desenvolver em ambientes com alta

concentrações de açúcares. Estudos citam as leveduras osmofílicas *Zygosacharomyces bailli* e *Z. rouxii* os principais micro-organismos deteriorantes em mel (PITT,HOCKING,2009;SILVA et al.,2010). Neste contexto, objetivou-se a redução de pelo menos 5 ciclos destes micro-organismos, valor mínimo da faixa de 5 a 10 ciclos indicada na literatura (STUMBO, 1973).

Além da redução microbiológica das leveduras osmofílicas, foi estipulado que durante o processamento, a temperatura máxima atingida dentro das embalagens permanecesse mais próxima do limite inferior da faixa de valores citados em trabalhos envolvendo pasteurização do mel (Tabela 10), visando também a preservação de suas propriedades sensoriais, conforme abordado no item 3.4.3.

Tabela 10. Referências de temperaturas de processo encontradas na literatura.

Origem	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Referência
<i>A. mellifera</i>	60	30,00	(EUA,2005)
	63	30,00	(NOGUEIRA-NETO,1997) (LABROPOLUS,ANESTIS,2012) (MENEZES et al.,2013)
Abelhas sem ferrão	65	5,00	(VENTURIERI et al.,2007)
		*	(VENTURIERI,2008)
		*	(VILLAS-BÔAS,2012)
**	65 a 68	*	(WITTER,NUNES-SILVA,2014) (SILVA et al.,2010)

*O tempo (minutos) não foi indicado na literatura.

** Indicado para produtos susceptíveis à deterioração por *Z. bailli*.

Na apresentação dos resultados, serão mostrados os históricos de temperatura e o cálculo da letalidade do processo de pasteurização em função dos micro-organismos alvos. O cálculo da intensidade do tratamento térmico foi realizado utilizando-se a Equação 11, com resolução pelo método numérico, através da metodologia dos trapézios (CUNHA,2003).

$$P = \int_{t_0}^t 10^{\frac{T_p - T_{ref}}{z}} . dt \quad (11)$$

Sendo:

P = Intensidade do tratamento térmico (letalidade)(minutos);

T_p = temperatura do produto no instante t (°C),

T_{ref} = temperatura de referência do micro-organismo alvo (°C);

z = constante de resistência térmica do micro-organismo alvo (°C).

Os valores de D e z utilizados estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Micro-organismos alvos e respectivos D e z utilizados para cálculo de P.

Micro-organismos deteriorantes	T_{ref} (°C)	D (máx.) (minutos)	Valor z (°C)	Referência D, z
<i>Zygosaccharomyces bailli</i> (células vegetativas)	60,00	0,40	3,9	(1)
<i>Z. rouxii</i>	65,50	0,40	8,0	(2) e (3)

(1) (TUCKER,2016); (2) (SILVA et al.,2010); (3) (PITT,HOCKING,2009).

4.2.3.2 Condições de armazenamento: Refrigeração e Temperatura ambiente

As caixas com amostras de mel referentes aos testes T02 e T04 foram mantidas sob-refrigeração ($5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) na câmara de refrigeração descrita no item 4.1.2 As caixas com amostras denominadas T01 e T03 foram armazenadas em um armário à temperatura ambiente, ausente de luz.

Todas as caixas foram armazenadas nas condições supracitadas durante 12 meses. Estas condições de temperaturas foram escolhidas por serem as formas mais usuais de armazenamento de mel de abelha sem ferrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação preliminar ao processo de pasteurização

5.1.1 Ensaio 1

As curvas dos históricos de temperaturas obtidas durante o primeiro ensaio realizado no tanque de pasteurização distribuição de temperatura estão apresentadas na Figura 13. A linha horizontal tracejada mostra a temperatura máxima alcançada no equipamento de processo (77,59°C). A linha vertical tracejada indicada mostra o tempo em que temperatura máxima foi atingida (135,35 minutos).

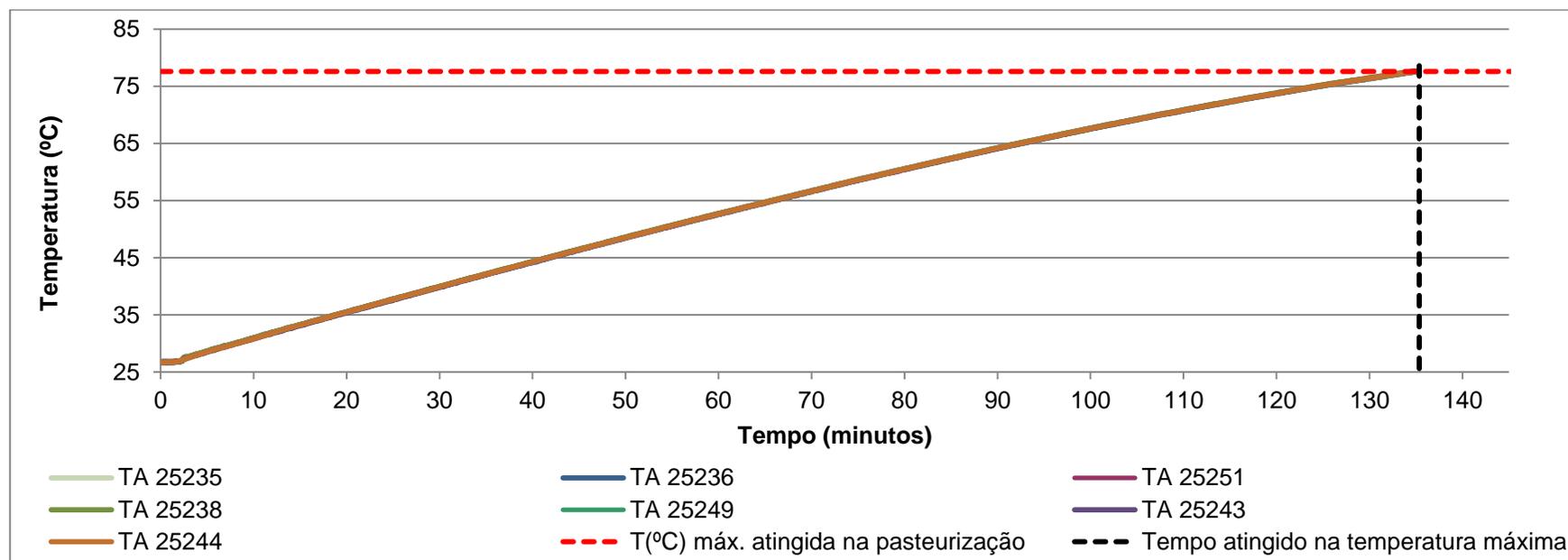


Figura 13. Históricos de temperatura obtidos durante o ensaio de distribuição de temperatura.

Foi possível observar na figura 10 que os termopares que monitoraram a temperatura do meio de aquecimento do tanque (TA) apresentaram curvas de aquecimento praticamente sobrepostas. Através do histórico de temperatura foi possível também ordená-los em função da menor média durante o aquecimento, segundo a Tabela 12.

Tabela 12. Classificação das curvas de temperatura ordenadas em função da menor média durante o aquecimento.

Termopar ambiente (TA)	Temperatura (°C)
25249	54,63
25243	54,66
25244	54,73
25235	54,74
25251	54,80
25236	54,80
25238	54,82
25246	54,83

Constata-se que a diferença entre a média de temperatura do meio de aquecimento obtidos ao longo do teste foi menor que 0,20°C, confirmando a similaridade dos perfis de subida de temperatura. Segundo o protocolo do IFTPS (2014), por exemplo, na avaliação de distribuição de temperatura em autoclaves, os termopares devem estar com no mínimo uma diferença de 0,50°C em relação à temperatura de processo.

No mesmo ensaio, seis frascos de mel foram monitorados e as curvas de temperatura foram ordenadas em função do menor valor de letalidade (valor P) obtido, calculado em relação ao micro-organismo alvo deteriorante, *Zygosaccharomyces rouxii*, conforme dados da Tabela 13.

Tabela 13. Classificação das curvas de temperatura ordenadas em função do menor valor P durante a etapa de aquecimento.

Termopar	Comprimento poço (mm)	Cesto	Camada	Valor P (minutos)
25250	35	1	2	312,99
25241	40	2	2	327,20
25245	35	1	1	328,40
25242	40	1	1	341,45
25247	35	2	2	369,78
25253	35	2	1	436,03

De acordo com os resultados obtidos, não foi possível definir a região de aquecimento da embalagem e conseqüentemente o poço mais adequado para os ensaios de penetração de calor, pois os resultados obtidos não apresentaram uma

indicação objetiva que relacionasse o valor da letalidade e altura do termopar dentro da embalagem (comprimento do poço).

5.1.2 Ensaio 2

As curvas dos históricos de temperaturas dos termopares ambientes (TA) e produtos obtidos durante o segundo ensaio, conduzido no banho termostático, estão apresentados na Figura 14. A linha horizontal tracejada mostra a temperatura máxima alcançada no tratamento térmico (79,67°C). A linha vertical tracejada preta mostra o tempo em que temperatura máxima foi atingida (32,45 minutos).

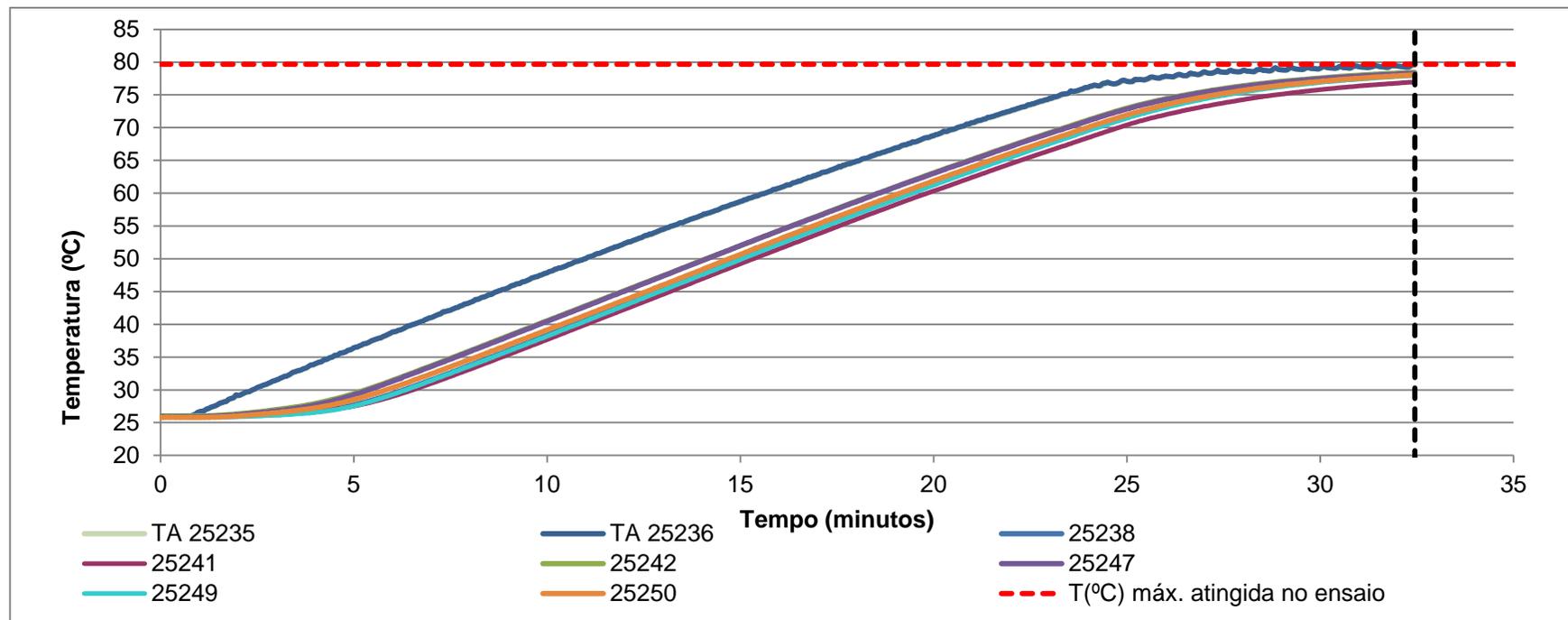


Figura 14. Históricos de temperatura obtidos durante o segundo ensaio de distribuição de temperatura.

Durante o aquecimento, os dois termopares instalados no banho termostático apresentaram diferença de 0,06°C, mostrando boa homogeneidade na temperatura do equipamento, de acordo com a Tabela 14.

Tabela 14. Termopares de monitoramento do banho termostático.

Termopar ambiente (TA)	Temperatura média (°C)	Temperatura máxima (°C)
25235	58,55	79,56
25236	58,61	79,67

Com os históricos de temperaturas obtidos durante o aquecimento, foram calculados os valores de P para cada frasco monitorado, com o valor z do micro-organismo alvo deteriorante, *Zygosaccharomyces rouxii*. Esses valores são mostrados em ordem crescente na Tabela 15.

Tabela 15. Classificação das curvas de temperaturas ordenadas em função do menor valor P durante a etapa de aquecimento.

Termopar	Comprimento poço (mm)	Frasco	Valor P (minutos)
25241	40	2	120,77
25249	40	5	164,74
25238	40	1	175,16
25250	35	6	175,47
25247	35	4	202,11
25242	35	3	210,02

Pode-se concluir que os três menores valores de P (frascos 2, 5 e 1) obtidos neste ensaio, foram observados nos vidros instrumentados com poços de 40 mm, cuja aquisição de temperatura refere-se à altura de 8 cm medida a partir da base do frasco de vidro, no eixo radial.

Com isso, decidiu-se por realizar os ensaios de penetração de calor no tanque de pasteurização, com frascos instrumentados com poços de 40 mm distribuídos nos cestos 1 e 2, pois, o mesmo apresentou boa homogeneidade de temperatura durante o aquecimento.

5.2 Avaliação dos processamentos aplicados

5.2.1 Condições de armazenamento: Refrigeração e Temperatura ambiente

Conforme descrito na metodologia, as caixas com amostras de mel dos testes T02 e T04 foram mantidas sob-refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e as T01 e T03 foram

mantidas à temperatura ambiente durante 12 meses, sendo retiradas apenas as embalagens necessárias para realização das análises periódicas previstas.

5.2.2 Processo de pasteurização

As curvas dos históricos de temperaturas obtidas durante o ensaio de pasteurização em mel de *M. mondury*, referentes aos testes T01 e T02 estão apresentadas na Figura 15.

Também foram representadas graficamente as curvas de valores de P calculados em função do micro-organismo alvo *Zygosaccharomyces rouxii* conforme Tabela 16.

A linha horizontal tracejada mostra a temperatura máxima alcançada no tratamento térmico de 63,01°C registrada no frasco 6, localizado no cesto 2, camada 1. Essa temperatura é 5°C menor do que o valor máximo da faixa de 60 a 68°C (Tabela 10), que engloba as temperaturas aplicadas em processos de pasteurização de mel, indicando portanto, maior probabilidade de manutenção das propriedades sensoriais do produto não processado.

A primeira linha vertical tracejada indica o tempo em que essa temperatura máxima de 63,01 foi atingida (108,60 minutos) enquanto que a segunda linha vertical tracejada representa o término do processo após o resfriamento.

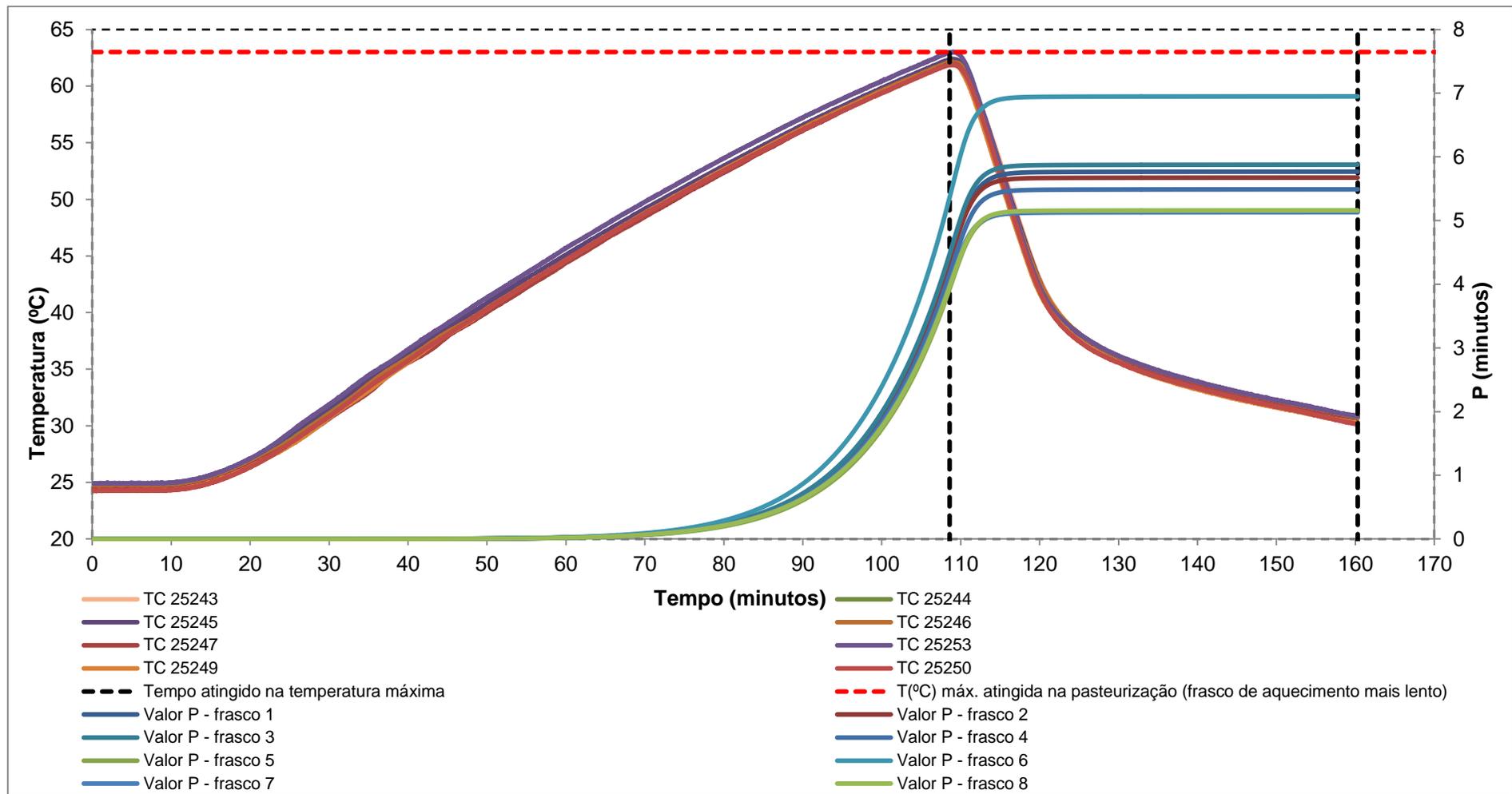


Figura 15. Históricos de temperatura obtidos durante o ensaio de penetração de calor em méis testes T01 e T02. Valores de P calculados em função do *Z. rouxii*.

A menor temperatura inicial registrada antes do início da pasteurização foi constatada no frasco 8 (24,27°C), localizado no cesto 2, camada 2. O ensaio de penetração de calor iniciou juntamente com as aquisições de temperatura acompanhadas pelo sistema E-Val Flex. O tratamento térmico totalizou 160,30 minutos.

A Tabela 16 apresenta os valores de P calculados para os frascos monitorados durante o processo térmico, levando em consideração os parâmetros de resistência térmica de micro-organismos deteriorantes (leveduras osmofílicas). Os valores de P estão ordenados de forma crescente.

Tabela 16. Cálculo de intensidade do tratamento térmico (P) nos frascos de méis monitorados durante a pasteurização.

Micro-organismos deteriorantes não-esporulados							
Nº sensor	Frasco	Temperatura (°C)		<i>Z. bailli</i>		<i>Z. rouxii</i>	
		inicial	máxima	Valor P (minutos)	Valor n (nº ciclos)	Valor P (minutos)	Valor n (nº ciclos)
25249	7	24,28	61,88	24,77	61,92	5,13	12,83
25247	5	24,34	61,90	25,26	63,15	5,14	12,84
25250	8	24,27	61,89	25,11	62,78	5,16	12,90
25246	4	24,55	62,10	28,59	71,46	5,49	13,72
25244	2	24,31	62,19	30,22	75,54	5,67	14,19
25243	1	24,31	62,26	31,27	78,16	5,77	14,42
25245	3	24,57	62,36	32,78	81,95	5,88	14,69
25253	6	24,94	63,01	46,55	116,36	6,95	17,37

Considerando-se a redução de no mínimo 5 ciclos para os micro-organismos alvos deteriorantes *Z. bailli* e *Z. rouxii*, a letalidade (valor P) necessária seria de 2 minutos. Os resultados mostrados na Tabela 16 indicam que os valores obtidos experimentalmente foram superiores à este requisito mínimo, com valores P de 24,77 minutos e 5,13 minutos, respectivamente, correspondendo a 61,9 e 12,8 reduções decimais destes micro-organismos. Apesar dos mesmos serem superiores ao valor mínimo estipulado, o número de reduções de *Z. rouxii* ficou apenas 2,8 ciclos acima do máximo número de ciclos indicado para redução de micro-organismos deteriorantes, de 5 a 10 ciclos (STUMBO, 1973).

A pasteurização apresenta várias vantagens comparadas com outras tecnologias de processamento, tais como: a eliminação de micro-organismos patogênicos, a possibilidade do armazenamento do mel à temperatura ambiente

sem adulteração microbiológica e ausência de processos fermentativos (MENEZES et al.,2013).

A pasteurização também previne e/ou adia a cristalização (BILUCA et al.,2014;SILVA et al.,2010). A cristalização e o tamanho dos cristais formados são dependentes do teor de água, do ratio frutose/glicose e do histórico de aquecimento. Em muitos casos a cristalização do mel pode resultar no aumento da umidade da fase líquida o que pode favorecer o desenvolvimento de leveduras causando a fermentação do mel (CUI et al.,2008). Além disso, a dificuldade de manuseio envase, assim como a aceitação do produto pelo consumidor, são desvantagens relevantes do mel cristalizado (TOSI et al.,2002).

5.3 Caracterização físico-química dos méis durante a estocagem

Os resultados das análises físico-químicas obtidos nos quatro testes realizados no mel de *M. mondury* durante 1 ano de armazenamento estão apresentados na Tabela 17 e serão discutidos na sequência. Os valores de pH e acidez livre (mEq/kg) estão apresentados com duas casas decimais, conforme sugerido por (BOGDANOV,2002). Os resultados de sólidos solúveis e umidade estão apresentados com duas casas decimais e os valores obtidos de atividade de água estão apresentados com três casas decimais.

Tabela 17. Parâmetros físico-químicos de mel de *Melipona mondury* durante um ano de vida de prateleira, em função das análises físico-químicas realizadas.

Análises	**	0	15	60	120	180	240	300	360
Densidade									
absoluta		1353,5							
(kg/m ³)									
Atividade e água (A_w)	T01		0,707±0,001 ^{a,B}	0,705±0,00 ^{a,B}	0,722±0,001 ^{a,A,C}	0,724±0,000 ^{a,A,C,D}	0,719±0,002 ^{a,C,D,E}	0,722±0,000 ^{b,A,C,D,E,F}	0,720±0,005 ^{a,C,D,E,F}
	T02	0,726±	0,722±0,001 ^{b,A}	0,707±0,001 ^{a,E}	0,757±0,001 ^{b,F}	0,723±0,000 ^{b,A,B}	0,721±0,001 ^{a,B,C}	0,721±0,000 ^{a,A,B,C}	0,715±0,053 ^{a,G}
	T03	0,0A	0,703±0,000 ^{c,F}	0,718±0,001 ^{b,B}	0,720±0,002 ^{a,B,C}	0,726±0,001 ^{c,A,D}	0,729±0,001 ^{b,A,D,E}	0,720±0,000 ^{a,C}	0,728±0,000 ^{b,A,D,E}
	T04		0,713±0,000 ^{d,C}	0,724±0,000 ^{c,A}	0,742±0,001 ^{c,D}	0,730±0,001 ^{d,E}	0,747±0,017 ^{c,B}	0,732±0,006 ^{c,B}	0,755±0,001 ^c
Umidade (%)	T01		28,33±0,58 ^{a,A}	28,33±0,58 ^{a,A}	29,33±0,58 ^{a,A}	29,33±0,58 ^{a,A}	29,33±0,58 ^{a,A}	29,33±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}
	T02	29,67	29,67±0,58 ^{a,A}	28,33±0,58 ^{a,A}	28,33±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}	29,33±0,58 ^{a,A}
	T03	±0,58 ^A	28,33±0,58 ^{a,A}	28,67±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}	29,31±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}
	T04		29,33±0,58 ^{a,A}	29,33±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A}	29,67±0,58 ^{a,A,C}	31,67±0,58 ^{a,A}	32,33±0,58 ^{b,B,C}	32,33±0,58 ^{b,B}
pH	T01		3,66±0,06 ^{a,B}	4,00±0,09 ^{a,A,C}	3,77±0,05 ^{a,B,D}	3,76±0,0 ^{a,B,D,E}	3,88±0,05 ^{a,A,C,D,E,F}	4,10±0,04 ^{a,A,C}	3,75±0,01 ^{a,B,D,E,F}
	T02	3,94±	3,66±0,06 ^{a,B}	4,09±0,14 ^{a,A,C}	3,72±0,01 ^{a,b,B,D}	3,75±0,01 ^{a,b,B,D,E}	3,90±0,01 ^{b,A,E,F}	4,11±0,01 ^{a,b,A,C}	3,85±0,01 ^{c,A,D,E,F}
	T03	0,08 ^A	3,63±0,01 ^{a,F}	3,99±0,03 ^{a,B}	3,82±0,01 ^{a,c,C}	3,83±0,03 ^{c,C,D}	4,02±0,01 ^{c,A,B,E}	4,23±0,01 ^{c,G}	3,93±0,03 ^{b,A,B,D,E}
	T04		3,67±0,01 ^{a,B}	3,97±0,03 ^{a,A,C}	3,76±0,03 ^{a,b,c,B,D}	3,74±0,01 ^{a,b,B,D}	3,86±0,02 ^{a,b,A,D,E}	4,13±0,01 ^{a,b,F}	3,91±0,03 ^{a,b,A,C,E}
Acidez (mEq/kg)	T01		29,18±0,69 ^{a,B}	31,28±0,23 ^{a,B,C}	41,29±1,89 ^{a,E}	33,25±0,61 ^{a,A,C}	18,00±0,39 ^{a,F}	16,00±1,27 ^{a,D}	14,2±0,84 ^{a,D}
	T02	35,17±	31,15±1,49 ^{c,B}	31,02±0,38 ^{a,B,C}	34,28±0,59 ^{b,A,D}	32,82±0,23 ^{a,A,B,C,D}	17,23±0,39 ^{a,F}	15,87±0,65 ^{a,E}	15,7±1,22 ^{a,E}
	T03	1,83 ^A	26,58±1,05 ^{b,C}	34,42±0,30 ^{b,A}	40,47±0,99 ^{a,D}	33,44±0,75 ^{a,A}	17,11±3,32 ^{a,E}	14,50±1,24 ^{a,B}	14,83±0,28 ^{a,B}
	T04		28,15±0,39 ^{a,b,B}	30,68±1,46 ^{a,C}	30,18±0,93 ^{c,B,C}	32,91±1,12 ^{a,A}	19,80±0,82 ^{a,E}	14,09±0,31 ^{a,D}	15,45±0,34 ^{a,D}
Sólidos solúveis (%)	T01		71,67±0,58 ^{a,A}	71,67±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}	70,33±0,58 ^{a,A}
	T02	70,33±	70,33±0,58 ^{a,A}	71,67±0,58 ^{a,A}	71,67±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}	70,33±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}
	T03	0,58 ^A	71,67±0,58 ^{a,A}	71,33±0,58 ^{a,A}	70,33±0,58 ^{a,A}	70,33±0,58 ^{a,A}	70,33±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}	70,33±0,58 ^{a,A}
	T04		70,67±0,58 ^{a,A}	70,67±0,58 ^{a,A}	70,33±0,58 ^{a,A}	69,67±0,58 ^{a,A,C}	70,33±0,58 ^{a,A}	68,33±0,58 ^{b,B,C}	67,67±0,58 ^{b,B}

** Testes realizados em lote de mel de *M. mondury*.

Valores expressos como média±desvio padrão.

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p< 0,05).

^{A,B,C,D,E,F,G} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p< 0,05).

Os resultados obtidos na análise de atividade de água variaram de 0,703 a 0,757 durante o armazenamento por um ano nos testes T01 a T04. Conforme já mencionado, esta faixa limita o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos como *Salmonella spp.* e *E. coli*, entretanto, permite o crescimento ótimo de leveduras osmofílicas, principalmente do gênero *Zygosaccharomyces*, considerado portanto alvo da pasteurização. Em produtos com a_w abaixo de 0,85, os bolores e leveduras são os micro-organismos mais relevantes para estudo (SILVA et al.,2010). Os resultados apresentados na Tabela 17 indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as médias obtidas nas análises realizadas nos tempos 15 e 180 dias de acompanhamento de vida de prateleira (médias representadas pelas letras minúsculas apresentadas na Tabela 17).

A análise estatística também foi avaliada em função de cada teste ao longo de um ano, de acordo com a tabela 17. No teste T01, os tempos 15 e 60 não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, entretanto são diferentes em relação aos demais tempos analisados. No tratamento T02, as médias obtidas durante o armazenamento nas amostras inicial, 60, 120 e 360 dias são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Na avaliação do teste T03, somente a amostra com 15 dias de armazenamento diferiu-se estatisticamente ($p < 0,05$) em relação às demais análises realizadas ao longo do tempo de armazenamento. Foi possível verificar no tratamento T04 que as médias obtidas diferem-se estatisticamente ($p < 0,05$) nas análises realizadas em 15, 120, 180 e 360 dias.

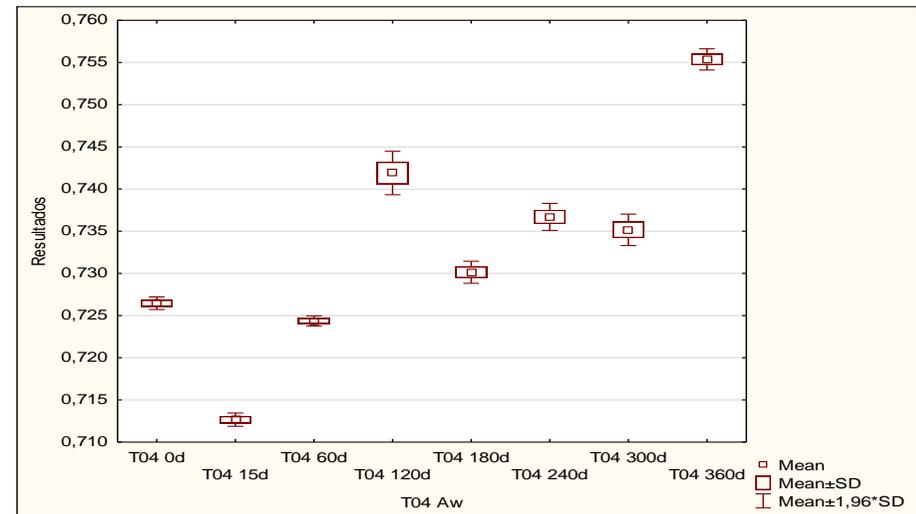
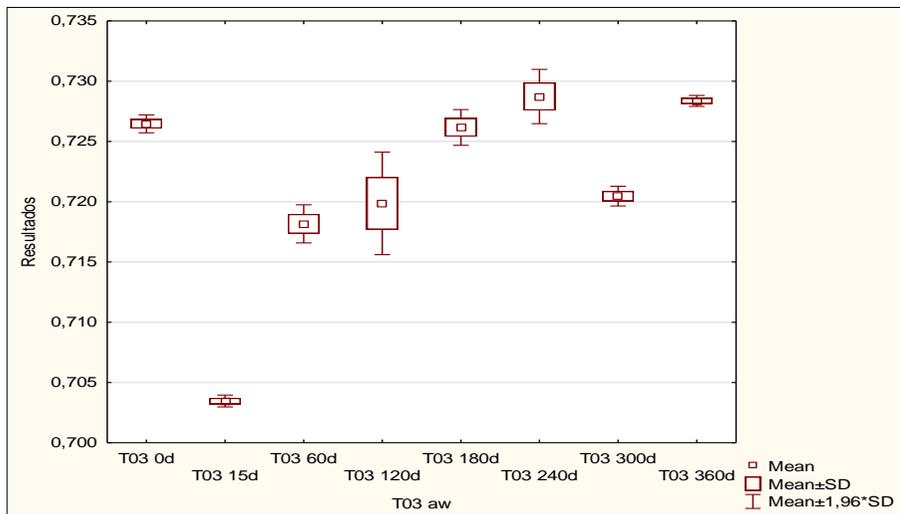
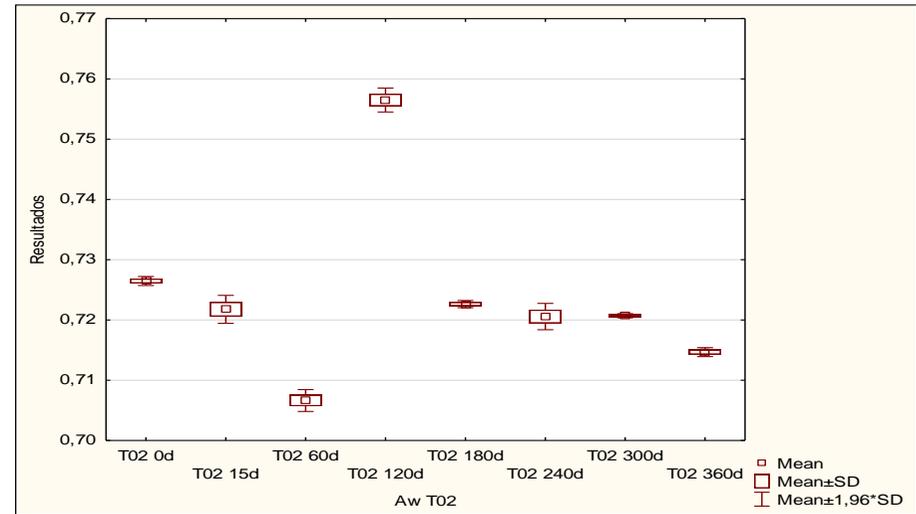
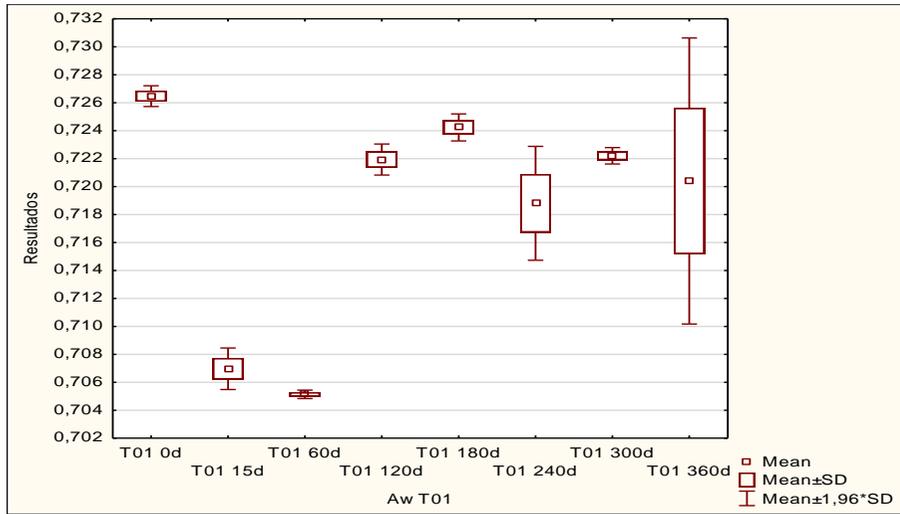


Figura 16. Análises estatísticas realizadas nos testes T01 a T04 para a_w durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).

O teor de umidade nos testes T01 a T04 variou de 28,33 a 32,3%. Todas as amostras apresentaram valores superiores aos preconizados pelas legislações brasileira e Codex (máximo 20%), fato que demonstra a necessidade de uma regulamentação própria para o mel de abelhas nativas.

Na análise estatística, comparando os resultados obtidos nos testes T01 a T04 em função do tempo de armazenamento (representados pelas letras minúsculas da tabela 15), somente o T04 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com 300 e 360 dias após o armazenamento. Em relação à análise estatística realizada por teste ao longo de um ano de armazenamento (representada pelas letras maiúsculas da tabela 15), pode-se observar que o T04 diferiu significativamente ($p < 0,05$) após 300 dias. Tais resultados podem ser visualizados na Figura 17.

O teor de umidade do mel de abelhas sem ferrão é resultante de vários fatores como a baixa taxa de desidratação do néctar durante o processamento do mel nos potes, coleta de néctar de flores mais rasteiras, frutos maduros ricos em água e a diversidade de espécies de abelhas (BILUCA,2014).

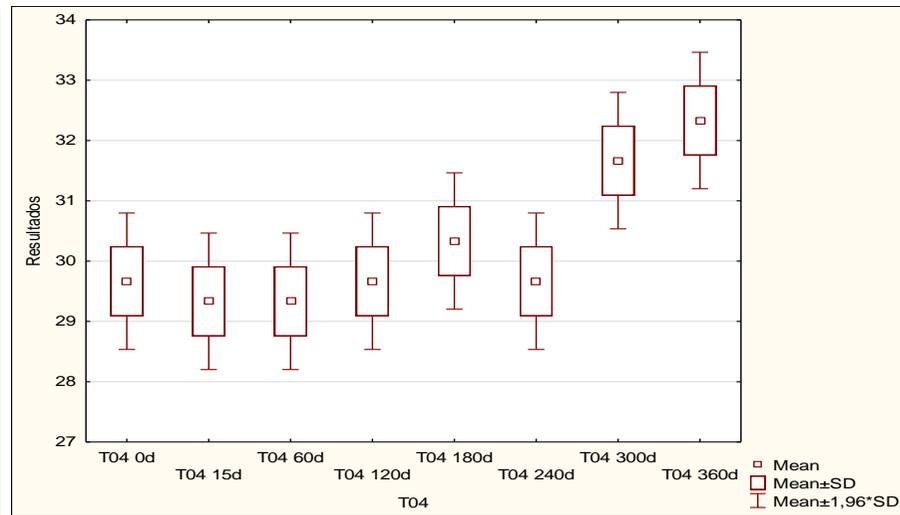
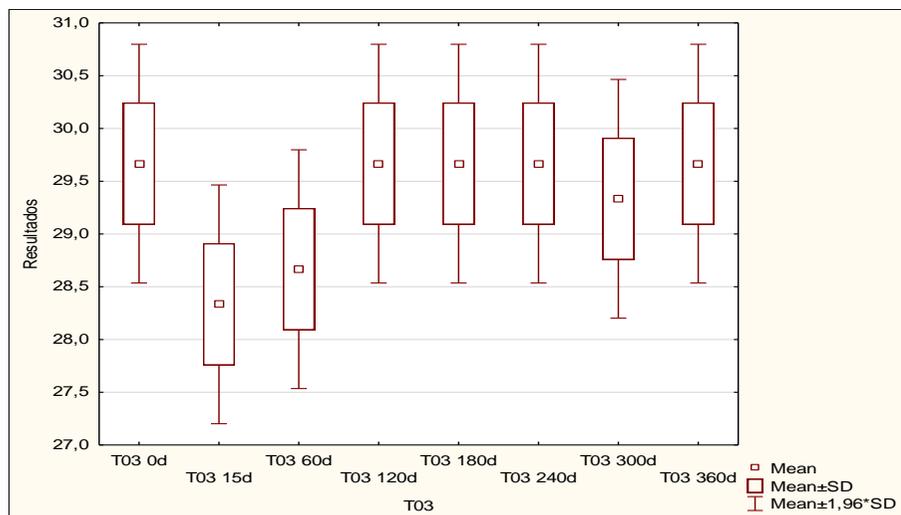
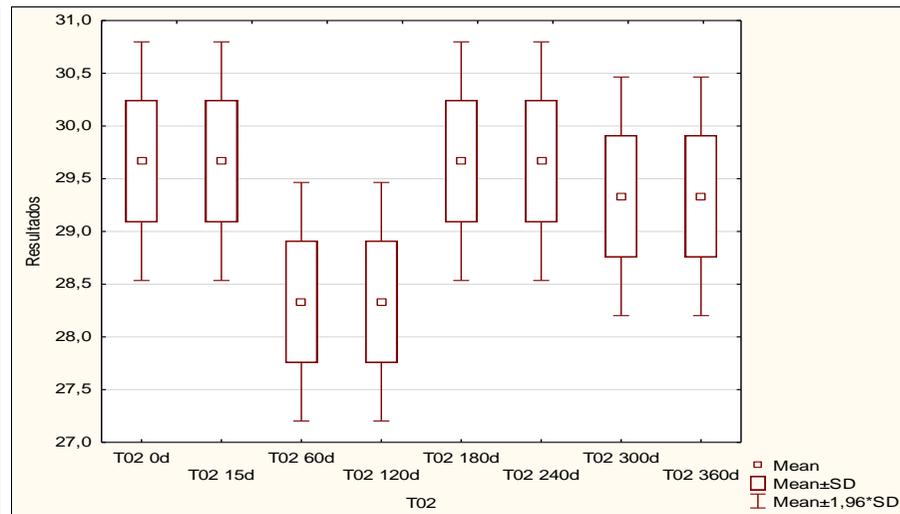
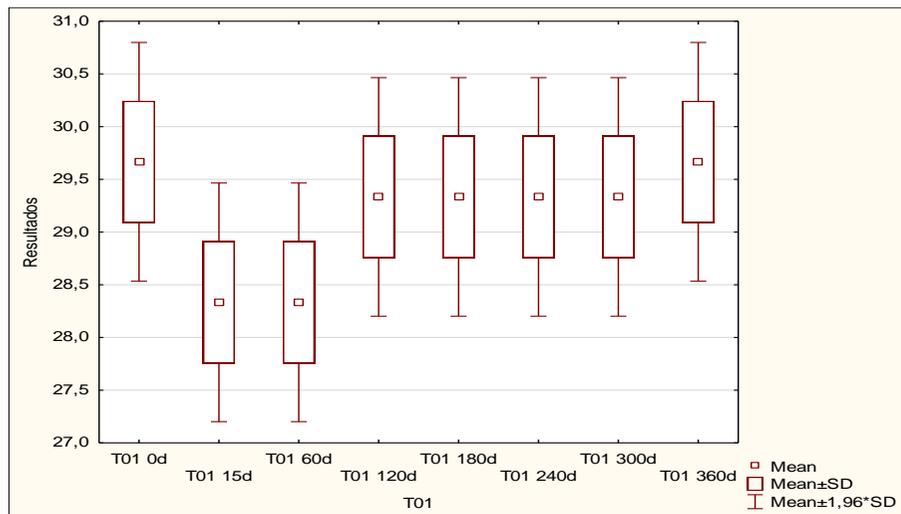


Figura 17. Análises estatísticas realizadas nos testes T01 a T04 para umidade durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).

As amostras analisadas apresentaram caráter ácido, tipicamente encontrado em mel de abelhas sem ferrão, sendo que as análises realizadas nos testes T01 a T04 apresentaram variação de 3,66 a 4,23 durante o tempo de armazenamento de um ano. Essa faixa de pH proporciona ao mel um importante fator antimicrobiano (GUERRINI et al.,2009). Tal como ocorre com a atividade de água, o pH desfavorável para o micro-organismo provoca um aumento na fase lag de multiplicação (ou fase latente: período de adaptação, intensa atividade metabólica) (LANDGRAF,2004). Outro fato importante a salientar é que os valores de pH e atividade de água encontrados nas amostras são inferiores à faixa de pH e atividade de água que classificam o produto baixa acidez ($pH > 4,6$ e $a_w > 0,85$) garantindo que esse mel não pertence, portanto, à categoria de alimento de risco de segurança de saúde pública quando armazenado em temperatura ambiente (BLACK,BARACH,2015).

Comparando estatisticamente os testes T01, T02, T03 e T04 ao longo do armazenamento, não foram observadas diferenças significativas entre as médias obtidas ($p < 0,05$) até 60 dias de armazenamento. Contudo, na análise estatística por tratamento ao longo do tempo de avaliação pode-se observar que no teste T03, os tempos 15 e 300 dias e no teste T04 somente o tempo 300 diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) de acordo com a Figura 18.

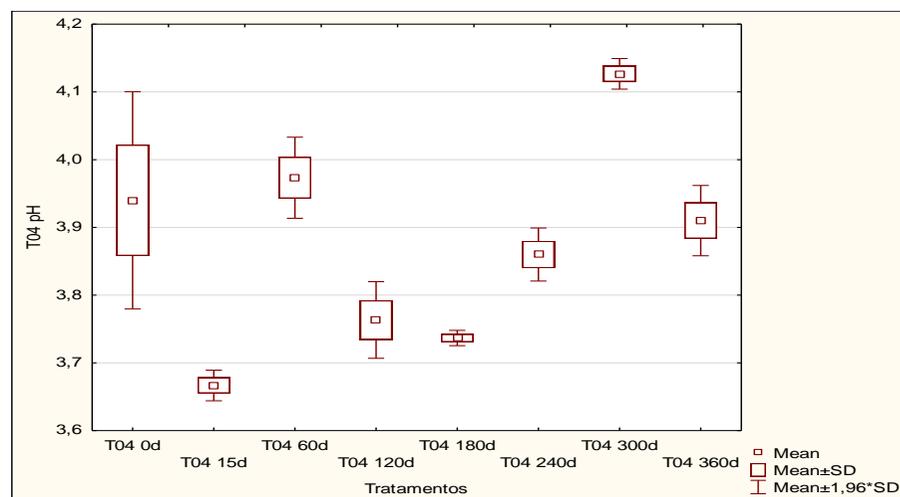
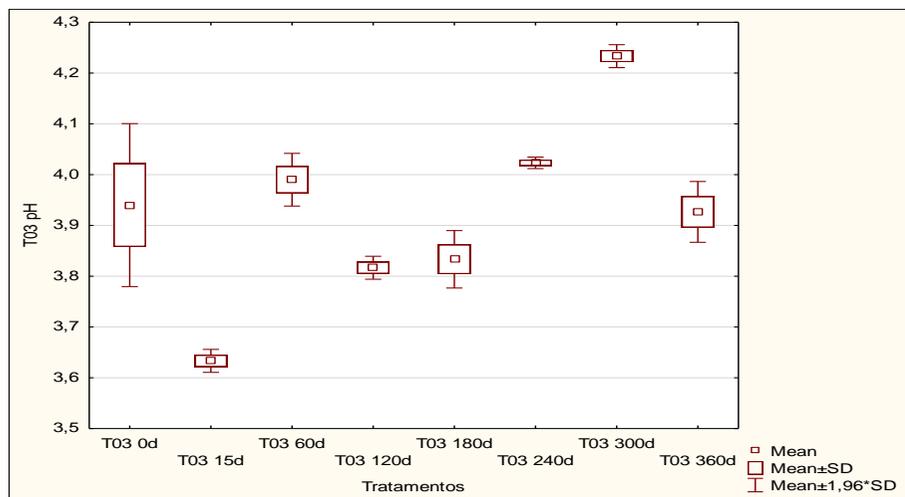
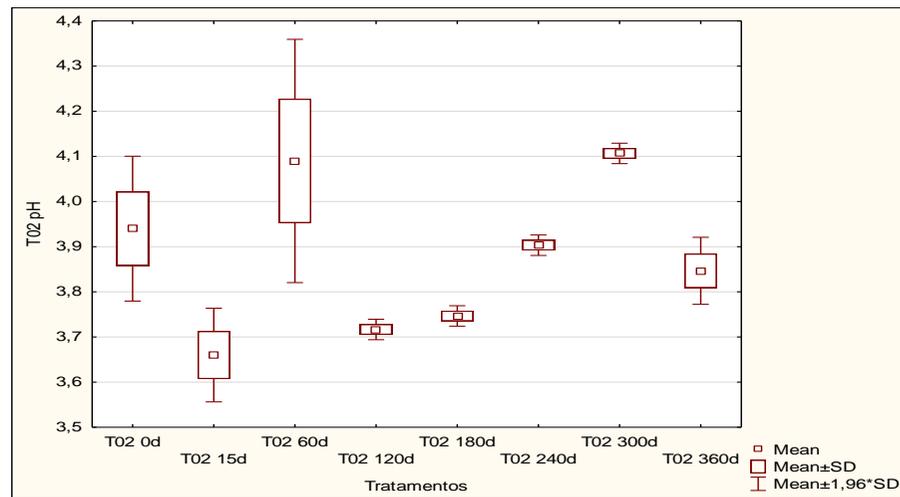
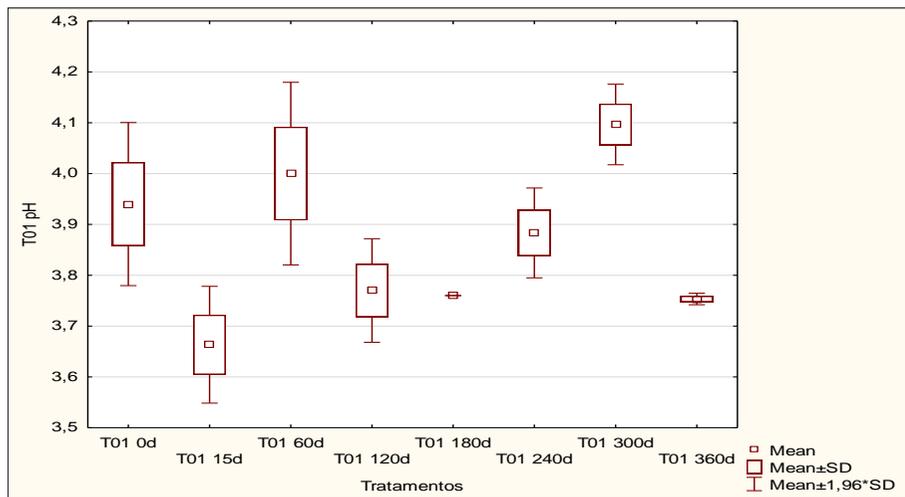


Figura 18. Análises estatísticas realizadas nos testes T01 a T04 para pH durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).

As análises de acidez livre apresentaram variação de 14,09 a 40,47 mEq/kg nos quatro testes avaliados. Os resultados obtidos estão em concordância com a legislação brasileira de *A. mellifera* de 50 mEq/kg (BRASIL,2000).

De acordo com a literatura, teores elevados de acidez livre é comum em mel de abelhas nativas mas é variável em função de suas características botânicas, localização, clima, entre outros fatores (LAGE et al.,2012).

O elevado teor de acidez indica a presença de ácidos orgânicos com baixa ionização. Essa acidez é responsável pela estabilidade em relação ao desenvolvimento microbiano dentro da colônia (MENEZES et al.,2013).

Verificou-se na análise estatística diferenças significativas ($p < 0,05$) até 120 dias nos testes T1 a T04. Analisando estatisticamente cada teste em função do tempo, de acordo com o teste T01 diferiu estatisticamente nos tempos 120 e 240 dias e os testes T02 e T04 diferiram estatisticamente somente no tempo 240 dias. Foi observado que o teste T3 apresentou diferenças estatísticas ($p < 0,05$) somente nos tempos 15, 120 e 240 dias após estocagem.

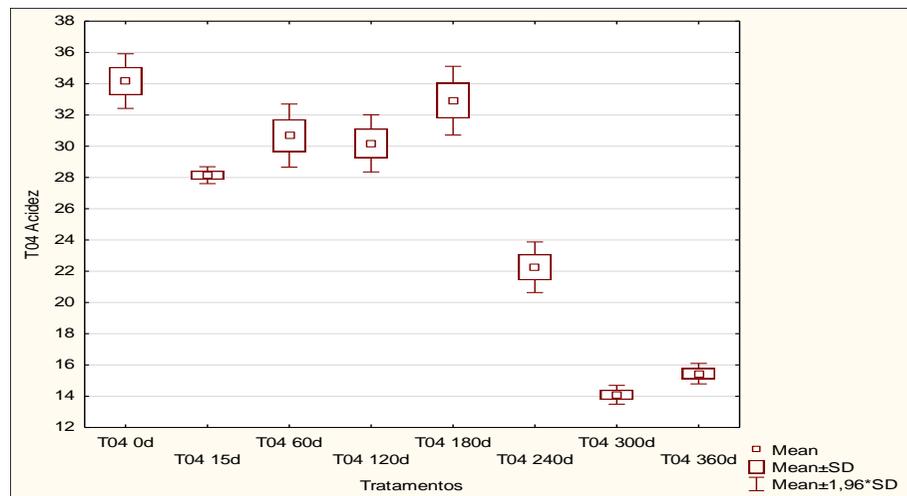
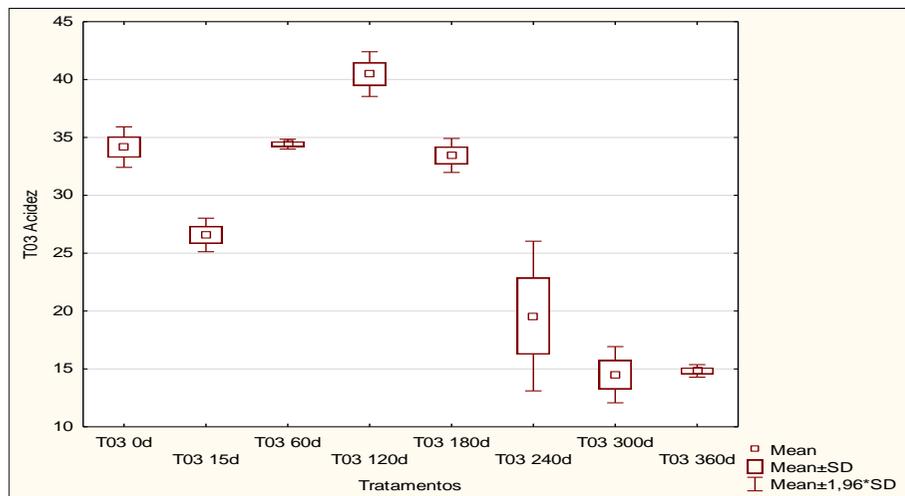
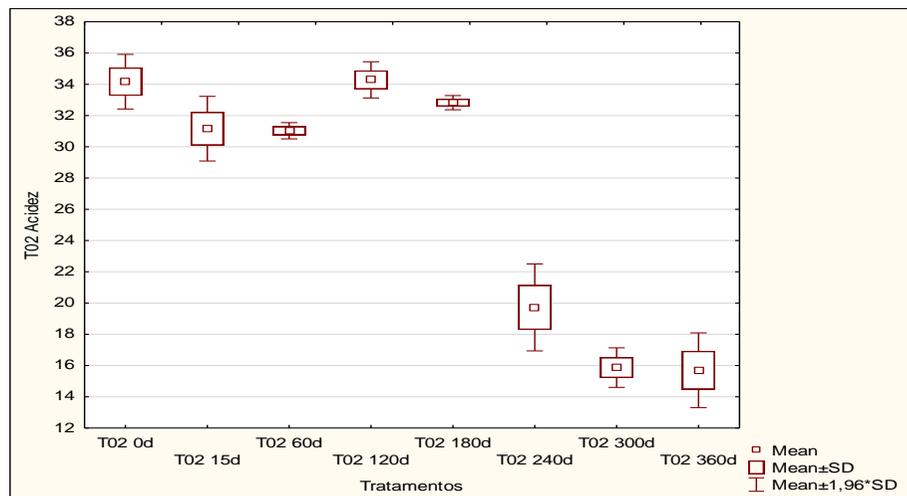
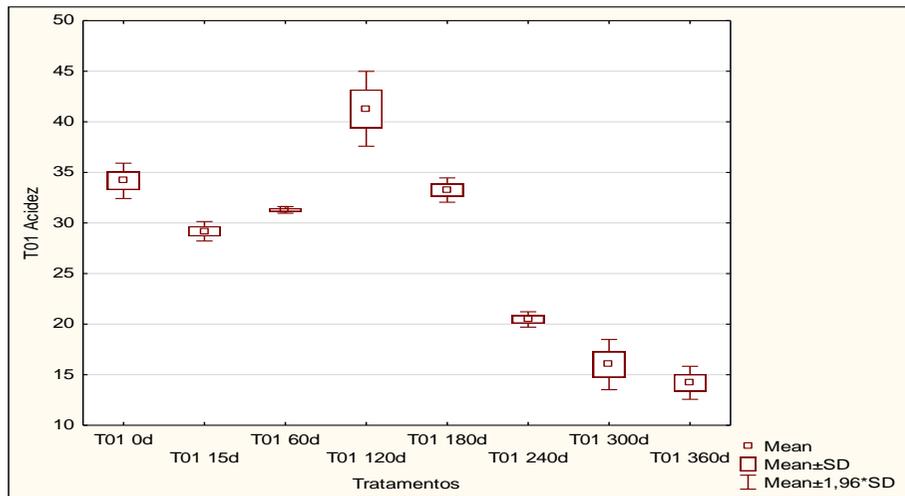


Figura 19. Análises estatísticas realizadas nos testes T01 a T04 para acidez durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).

O teor de sólidos solúveis apresentou variação de 67,67 a 71,67%. Na análise estatística realizada entre os testes T01 a T04 ao longo de um ano, somente o T04 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos tempos 300 e 360 dias.

Comparando estatisticamente cada teste em função do tempo (Figura 20) somente o T04 diferiu significativamente ($p < 0,05$) após 300 dias após o armazenamento.

Foi observada cristalização a partir de 60 dias de armazenamento nas amostras referentes ao teste T04. Tal característica possivelmente afetou a análise de sólidos solúveis, elevando, portanto, o teor de umidade das amostras já mencionado na literatura (CUI et al., 2008).

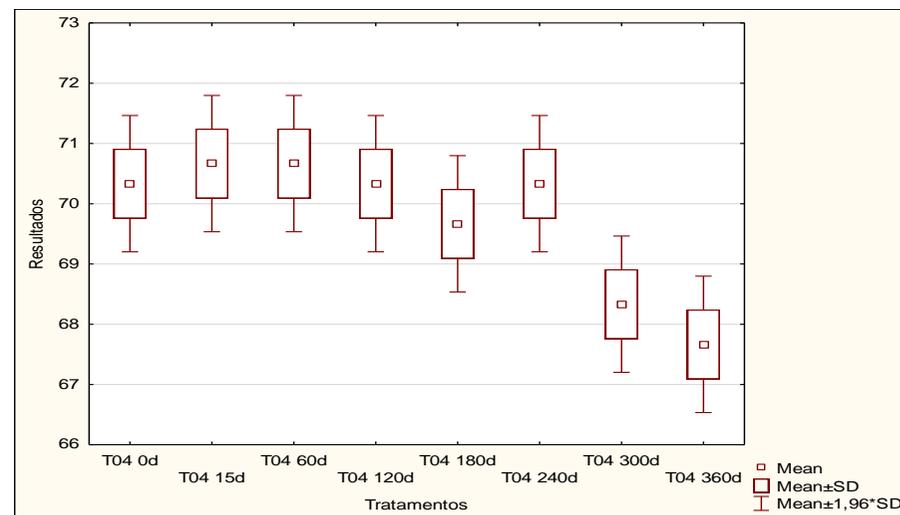
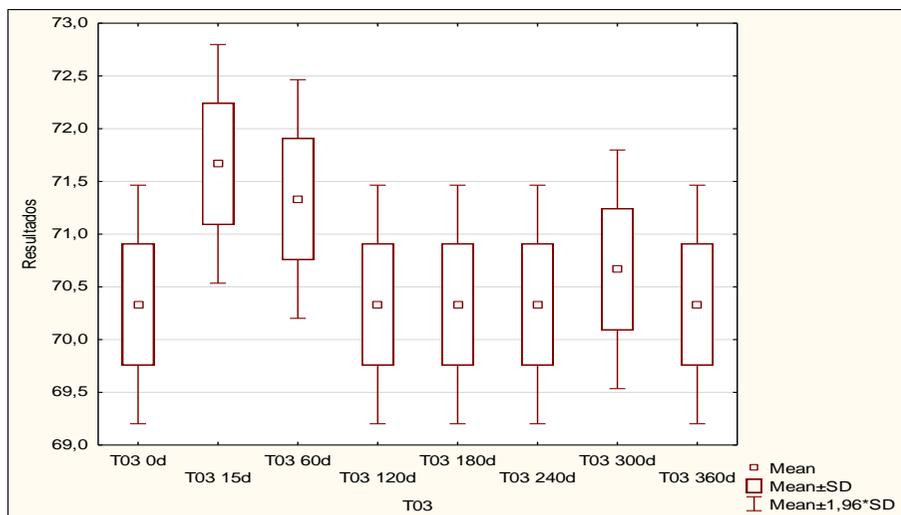
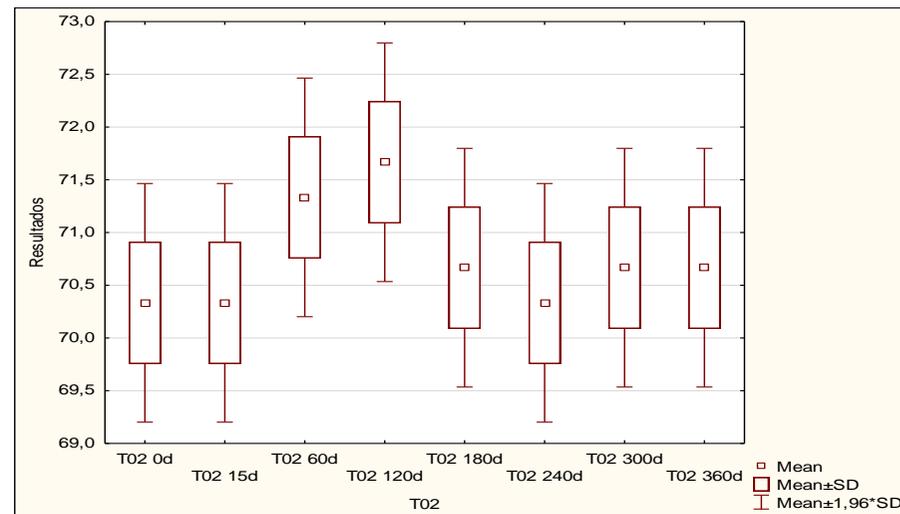
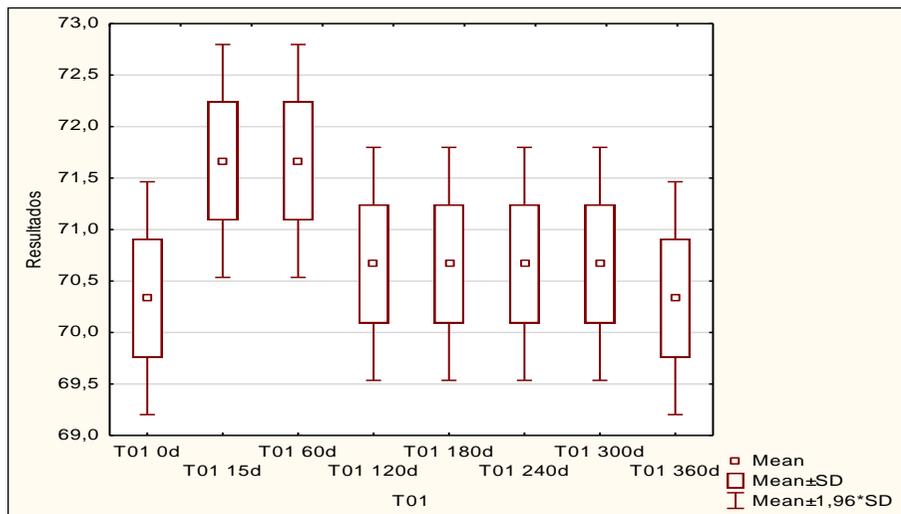


Figura 20. Análises estatísticas: testes T01 a T04 para sólidos solúveis durante o armazenamento. Fonte: (STATSOFT,2016).

Para um melhor entendimento da correlação entre os resultados obtidos nas análises físico-químicas durante um ano de avaliação, pode-se visualizar na Tabela 18 os valores máximos, mínimos e médios \pm DP (desvio padrão) em relação aos testes T01 a T04.

Tabela 18. Parâmetros físico químicos (valores máximos e mínimos) e médios \pm DP obtidos ao longo do armazenamento por um ano.

Análises	T01	T02	T03	T04
Atividade água (A_w)	0,705-0,726	0,707-0,757	0,703-0,729	0,713-0,755
	0,718 \pm 0,008 ^a	0,724 \pm 0,015 ^a	0,721 \pm 0,008 ^a	0,734 \pm 0,014 ^a
Umidade (%)	28,33-29,67	28,33-29,67	28,33-29,67	29,33-32,33
	29,17 \pm 0,536 ^a	29,25 \pm 0,587 ^a	29,33 \pm 0,536 ^{a,b}	30,50 \pm 1,356 ^b
pH	3,66-4,10	3,66-4,11	3,63-4,23	3,67-4,13
	3,86 \pm 0,148 ^a	3,88 \pm 0,166 ^a	3,92 \pm 0,175 ^a	3,87 \pm 0,148 ^a
Acidez (mEq/kg)	14,20-41,29	15,70-35,17	14,50-40,47	14,09-35,17
	27,30 \pm 9,99 ^a	26,66 \pm 8,73 ^a	27,07 \pm 10,33 ^a	25,80 \pm 8,17 ^a
Sólidos solúveis (%)	70,33-71,67	70,33-71,67	70,33-71,67	67,67-70,67
	70,84 \pm 0,54 ^a	70,79 \pm 0,56 ^a	70,67 \pm 0,54 ^{a,b}	69,75 \pm 1,14 ^{a,b}

De acordo com a análise estatística realizada os parâmetros de atividade de água, pH e acidez não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) ao longo de um ano de avaliação, de acordo com a figura 21 e 22.

Todavia, em relação aos parâmetros de umidade e sólidos solúveis, os testes T01, T02 e T03 não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). Já o teste T04 foi o único que diferiu estatisticamente em relação aos demais testes (T01, T02 e T03), durante um ano quanto aos valores de umidade e sólidos solúveis.

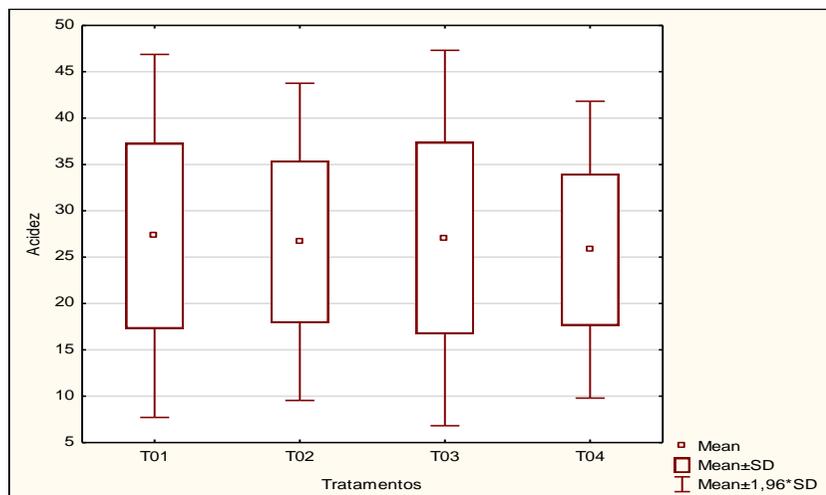
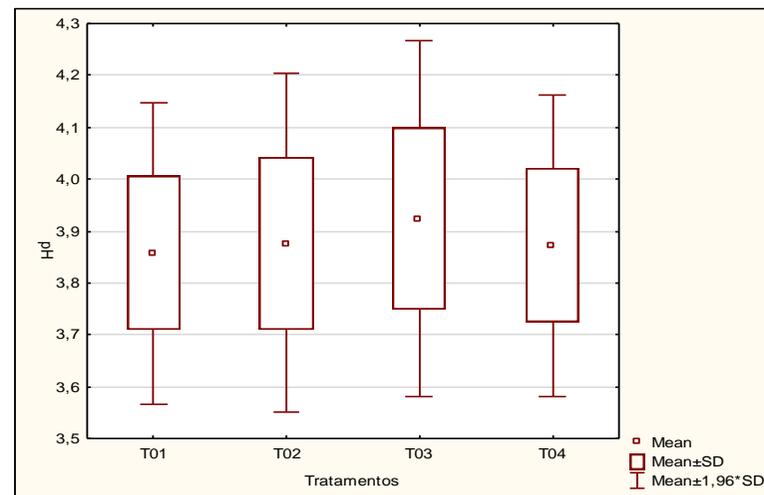
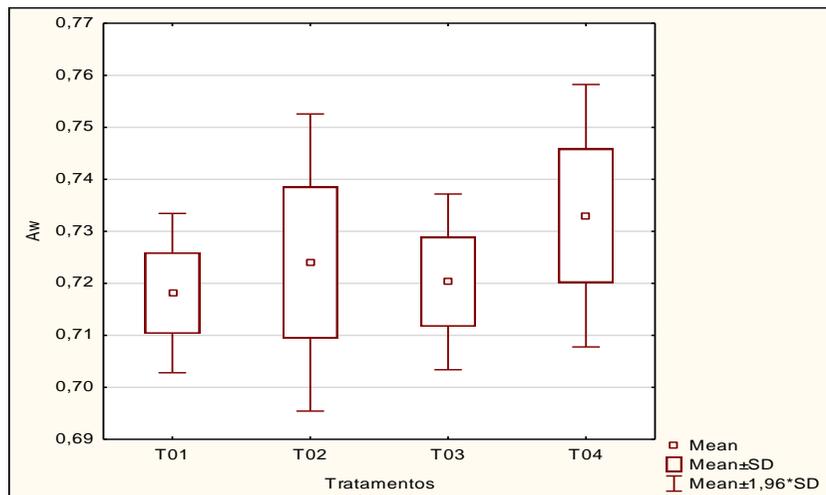


Figura 21. Parâmetros físico-químicos de atividade de água, pH e acidez médios ao longo de um ano de acompanhamento. Fonte: (STATSOFT,2016).

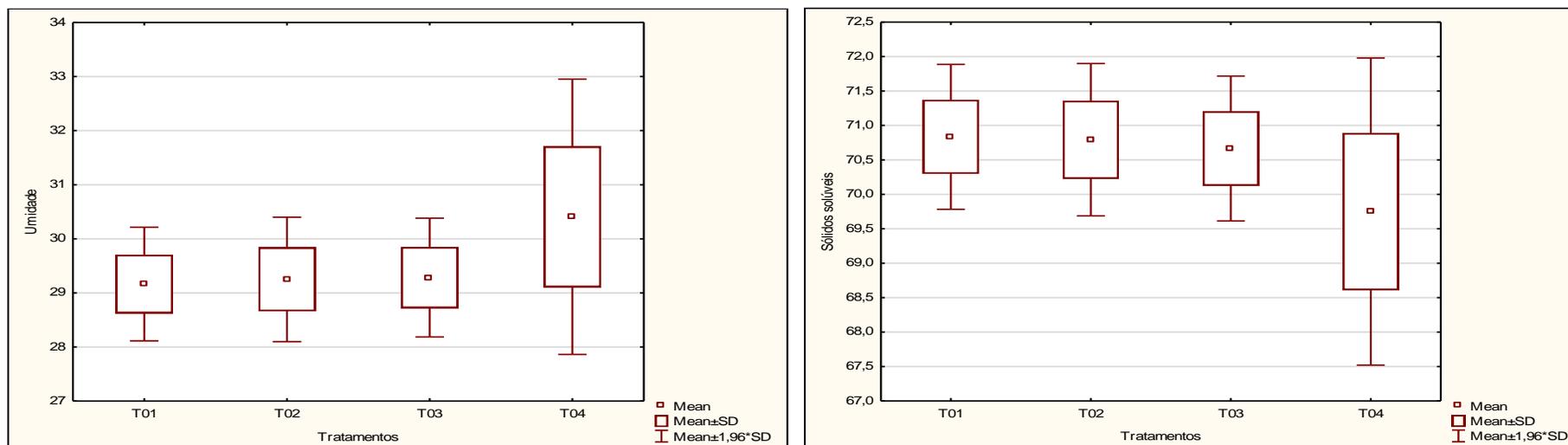


Figura 22. Parâmetros físico-químicos de umidade e sólidos solúveis médios ao longo de um ano de acompanhamento.

Fonte: (STATSOFT,2016).

5.3.1 Relação entre pH e atividade de água (a_w)

De acordo com as faixas de pH e atividade de água preconizadas pelas regulamentações do USDA e FDA, que compreendem a classificação dos alimentos, a Figura 23 mostra a relação dos valores médios de pH e atividade de água dos testes T01, T02, T03 e T04 obtidos ao longo de um ano de armazenamento (BLACK,BARACH,2015).

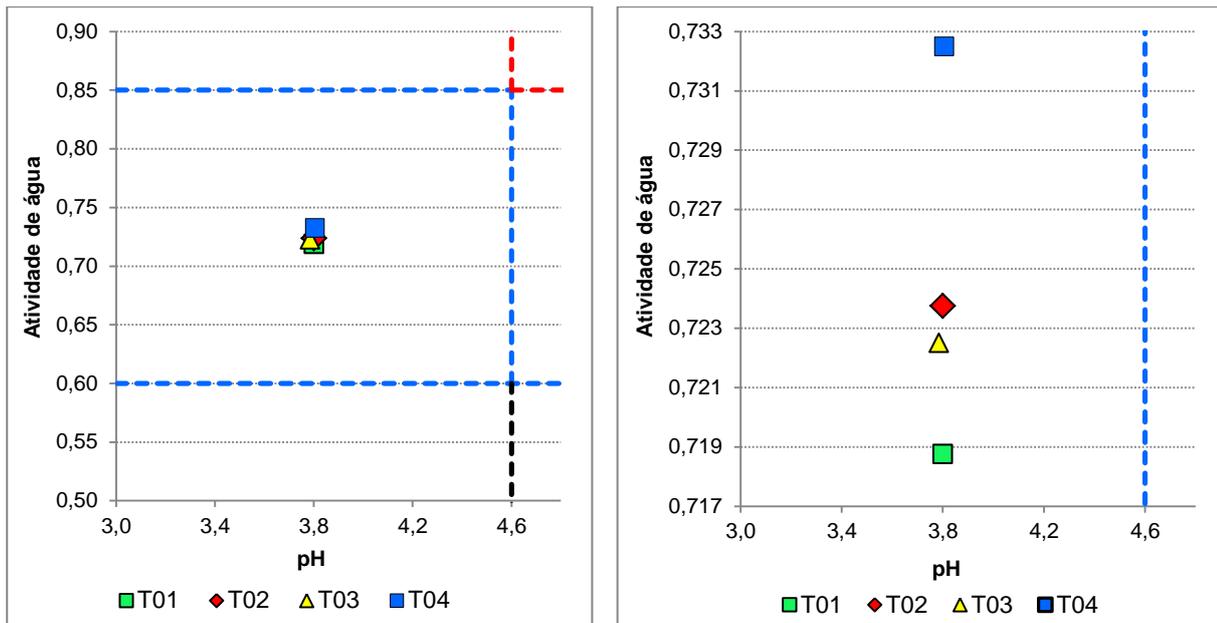


Figura 23. Relação entre pH e atividade de água, considerando os valores médios obtidos de cada teste.

Pode-se destacar que as amostras de méis dos quatro testes mantiveram valores médios de pH inferior a 4,6 durante 360 dias, esta condição classifica-os como um alimento ácido. Aliado ao baixo valor da atividade de água constatado, confirma-se que o mesmo não faz parte da categoria de alimento de alto risco de segurança de saúde pública ($a_w > 0,85$ e $pH > 4,6$), região representada graficamente pela linha vermelha tracejada.

Para produtos classificados como “ácidos” recomenda-se a combinação de métodos de conservação como a pasteurização e/ou refrigeração (RAHMAN,2007).

5.3.2 Análises de açúcares, ácidos e etanol durante estocagem

Na Tabela 19 estão apresentados os resultados obtidos das análises em HPLC realizadas nos testes T01, T02, T03 e T04.

Tabela 19. Resultados das análises realizadas em HPLC durante a estocagem de amostras referentes aos testes T01 a T04.

Amostra	Dias	Ácido Acético g/100 g	Ácido Lático g/100 g	Frutose g/100 g	Glicose g/100 g	ART g/100 g	Sacarose g/100 g	HMF mg/kg	Etanol g/100 g
Inicial	0	0,054	0,036	24,363	23,695		0,000	1,80	0,015
T01	15	0,050	0,033	24,471	23,742	48,213	0,000	*	0,000
	30	0,050	0,035	24,356	23,547	47,903	0,000	*	
	60	0,049	0,034	24,401	23,636	48,037	0,000	*	
	90	0,024	0,025	25,095	22,873	48,963	0,945	3,704	
	120	0,020	0,021	24,999	22,518	48,525	0,958	4,444	
	150	0,046	0,048	25,088	22,500	48,686	1,043	5,185	
	180	0,024	0,051	18,791	16,745	35,962	0,404	11,556	
	210	0,025	0,054	20,573	18,397	39,438	0,445	12,519	
	240	0,035	0,065	24,776	22,289	47,584	0,494	8,370	
	270	0,032	0,064	20,328	18,221	38,976	0,406	8,889	
	300	0,041	0,082	26,807	23,858	51,133	0,445	14,815	
	330	0,042	0,025	26,577	24,799	52,230	0,811	16,667	
360	0,044	0,054	26,012	23,258	49,951	0,648	23,111		
Valores médios T01		0,037	0,045	24,021	22,029	46,585	0,508	10,096	0,000
T02	15	0,055	0,036	24,349	23,595	47,945	0,000	*	0,000
	30	0,050	0,032	25,638	24,919	50,557	0,000	*	
	60	0,048	0,031	24,517	23,681	48,197	0,000	*	
	90	0,023	0,025	25,061	22,724	48,746	0,914	2,963	
	120	0,023	0,022	24,952	22,499	48,448	0,947	1,481	
	150	0,054	0,049	25,039	22,683	48,744	0,971	1,481	
	180	0,028	0,057	16,222	14,684	31,158	0,239	0,000	
	210	0,032	0,065	19,201	17,370	36,860	0,274	0,148	
	240	0,026	0,051	18,769	16,955	35,995	0,258	0,074	
	270	0,043	0,078	23,962	22,039	46,346	0,328	0,370	
	300	0,033	0,064	20,666	18,875	39,811	0,256	0,148	
	330	0,036	0,043	26,164	25,467	52,459	0,787	0,222	
360	0,048	0,055	27,336	25,988	54,144	0,778	0,741		

Amostra	Dias	Ácido Acético g/100 g	Ácido Lático g/100 g	Frutose g/100 g	Glicose g/100 g	ART g/100 g	Sacarose g/100 g	HMF mg/kg	Etanol g/100 g
Valores médios T02		0,038	0,047	23,221	21,652	45,339	0,442	0,857	0,000
T03	15	0,038	0,025	24,663	23,764	48,427	0,000	*	0,015
	30	0,049	0,028	24,612	23,781	48,393	0,000	*	0,016
	60	0,045	0,025	24,566	23,858	48,424	0,000	*	0,153
	90	0,021	0,021	24,656	22,510	48,255	1,035	2,963	0,123
	120	0,020	0,021	24,128	22,385	47,600	1,032	2,963	0,140
	150	0,039	0,038	24,506	22,732	48,382	1,087	4,444	0,352
	180	0,037	0,060	23,765	21,799	46,240	0,642	13,111	0,302
	210	0,038	0,064	25,337	22,975	48,909	0,567	13,630	0,313
	240	0,036	0,056	21,390	19,991	41,907	0,500	5,481	0,310
	270	0,025	0,047	17,254	15,840	33,504	0,389	5,481	0,283
	300	0,033	0,056	25,129	22,880	48,643	0,603	11,630	0,297
	330	0,025	0,036	25,965	24,088	50,972	0,874	14,296	0,275
360	0,033	0,035	25,871	24,833	51,552	0,805	19,407	0,206	
Valores médios T03		0,034	0,039	23,988	22,418	47,016	0,580	8,655	0,214
T04	15	0,037	0,025	24,605	23,821	48,425	0,000	*	0,000
	30	0,047	0,027	24,628	23,799	48,427	0,000	*	
	60	0,044	0,028	25,006	23,132	48,138	0,000	*	
	90	0,021	0,019	25,280	22,594	48,831	0,908	1,481	
	120	0,021	0,023	25,131	22,495	48,680	1,002	1,481	
	150	0,044	0,041	25,229	22,905	49,480	1,279	1,481	
	180	0,044	0,076	26,877	16,588	43,853	0,369	0,296	
	210	0,045	0,079	28,266	18,086	46,771	0,398	0,296	
	240	0,045	0,079	28,612	18,623	47,660	0,403	0,370	
	270	0,044	0,078	27,048	17,627	45,084	0,389	0,222	
	300	0,034	0,065	23,272	17,048	40,661	0,324	0,074	
	330	0,029	0,033	26,304	23,576	50,731	0,809	0,000	
360	0,052	0,055	29,179	19,458	49,538	0,856	0,519		
Valores médios T04		0,039	0,048	26,111	20,750	47,406	0,518	0,729	0,000

** Análise não realizada.

Em todas as amostras referentes aos testes T01, T02, T03 e T04 foram encontradas concentrações de ácidos acético e láctico, com valores médios ao longo do armazenamento de 0,037 e 0,045 g/100 g, respectivamente, que corresponde a 21,5% de maior predominância em ácido láctico em relação ao ácido acético, presente nos testes avaliados durante um ano, conforme figuras 24 e 25.

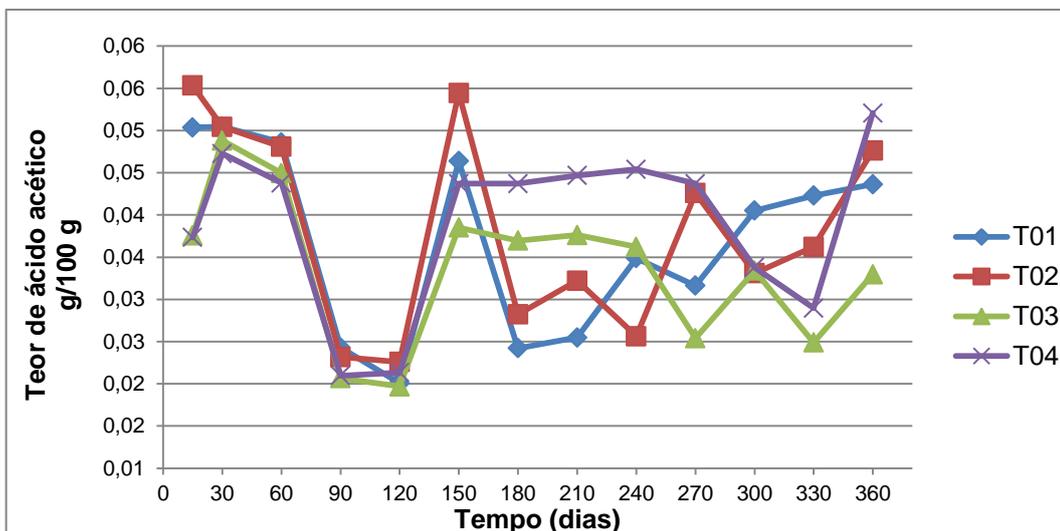


Figura 24. Concentração de ácido acético presente nos testes T01 a T04 durante o tempo de armazenamento por um ano.

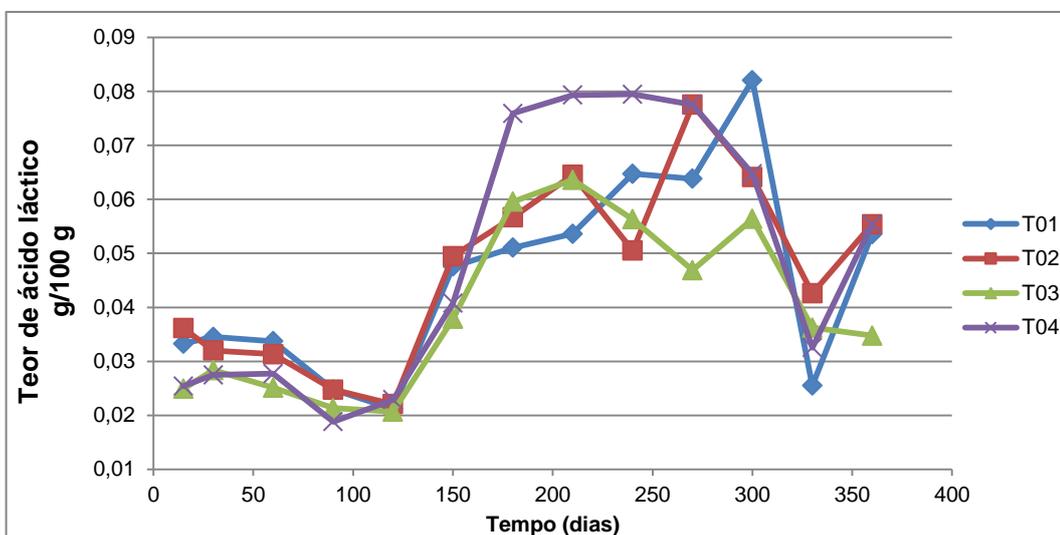


Figura 25. Concentração de ácido láctico presente nas amostras de mel nos testes T01 a T04 ao longo de um ano de estocagem.

Os maiores teores médios de ácido láctico foram verificados no teste T04, não pasteurizado, mantido sob-refrigeração (0,048 g/100g) enquanto que as

amostras referentes ao teste T03, sem pasteurização e mantido à temperatura ambiente apresentaram os menores teores durante a estocagem (0,039 g/100 g).

A presença destes ácidos orgânicos podem ocorrer no pólen e no mel de abelhas sem ferrão. Os açúcares são convertidos em ácidos ou outras moléculas orgânicas. Bactérias pertencentes aos gêneros *Streptococcus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os principais micro-organismos relatados na literatura responsáveis pela fermentação láctica, embora as leveduras e outros fungos possam realizar a mesma função (VIT et al.,2013).

As leveduras osmofílicas utilizam a frutose e glicose como substratos, resultando na liberação de dióxido de carbono e etanol. Posteriormente, a combinação com o oxigênio permite a produção de ácido acético (TOSI et al.,2002;TOSI et al.,2004).

Os maiores teores de ácido acético foram verificados nos testes em que não houve pasteurização, T04, mantido sob-refrigeração (0,039 g/100 g) e no teste T03, mantido à temperatura ambiente, foi obtido o menor valor médio (0,034 g/100 g) durante a estocagem. Portanto, as amostras do teste T04 apresentaram os maiores teores de ácidos acético e láctico e o teste T03, obteve os menores valores médios de ácidos orgânicos analisados ao longo de um ano de armazenamento.

Foram observados valores médios durante o armazenamento de 24,335 g/100 g de frutose e 21,712 g/100 g de glicose, mostrando maior predominância da frutose em todas as amostras analisadas. Os méis de meliponíneos possuem menores teores de açúcares em relação aos méis de *A. mellifera* e normalmente a frutose é predominante, responsável pelo dulçor e higroscopicidade (ALVES et al.,2005;HOLANDA et al.,2012).

É considerada a fração principal na formação de HMF, devido à ação de ácidos e calor (JIMENEZ et al.,2016). A frutose determina o perfil higroscópico e a glicose, a velocidade de cristalização do mel (DIMINS et al.,2006).

A maior concentração média de frutose foi verificada no T04 (26,111 g/100g) e o menor teor, no teste T02 (23,221 g/100 g). Em relação os teores médios de glicose, o teste T03 obteve o maior teor durante o armazenamento (22,418 g/100 g) enquanto que o T04 apresentou o menor valor correspondente a 20,750 g/100 g. Os resultados discutidos estão apresentados graficamente nas figuras 26 e 27.

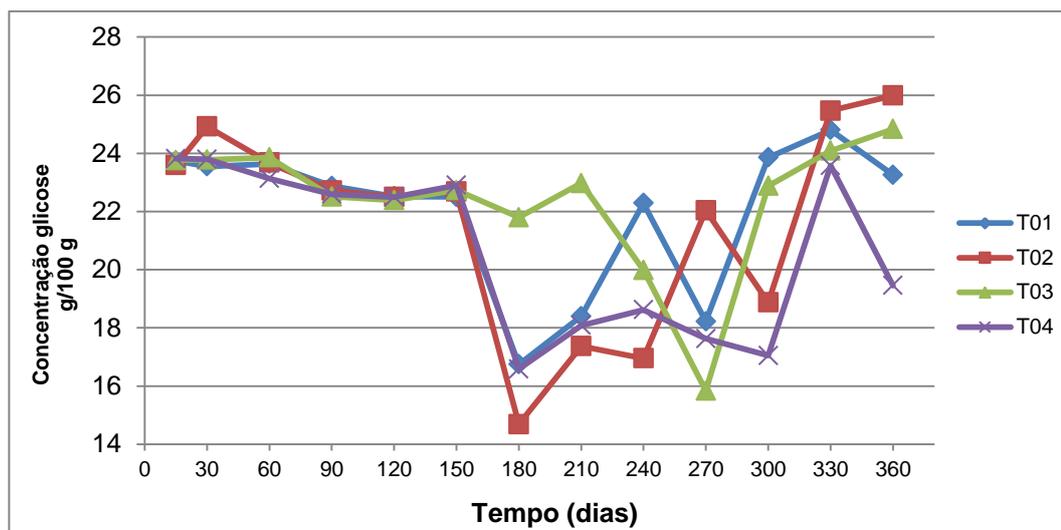


Figura 26. Concentração de glicose nas amostras de mel dos testes T01 a T04 ao longo do tempo de estocagem.

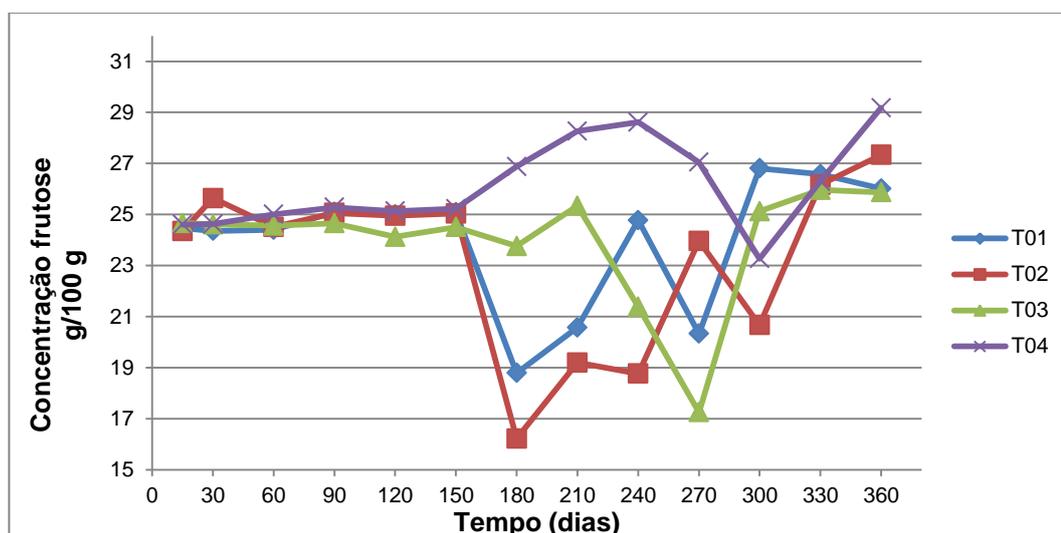


Figura 27. Concentração de frutose nas amostras de mel nos testes T01 a T04 durante um ano de acompanhamento.

A tendência de cristalização em méis de abelha sem ferrão está diretamente relacionada a alguns parâmetros como os ratios frutose/glicose (F/G) e glicose/umidade (G/U). Estes índices também são importantes na identificação da origem botânica do mel (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2014). Na Tabela 20 estão apresentados os valores de ratios de frutose/glicose ao longo de um ano de armazenamento das amostras T01 a T04 e na Tabela 21 estão dispostos os ratios de glicose/umidade durante o armazenamento dos testes T01 a T04.

Tabela 20. Ratios frutose/glicose (F/G) obtidos nos testes T01 a T04 durante o armazenamento.

Tempo armazenamento (dias)	T01	T02	T03	T04
15	1,031	1,032	1,038	1,033
30	1,034	1,029	1,035	1,035
60	1,032	1,035	1,030	1,081
90	1,097	1,103	1,095	1,119
120	1,110	1,109	1,078	1,117
150	1,115	1,104	1,078	1,101
180	1,122	1,105	1,090	1,620
210	1,118	1,105	1,103	1,563
240	1,112	1,107	1,070	1,536
270	1,116	1,087	1,089	1,534
300	1,124	1,095	1,098	1,365
330	1,072	1,027	1,078	1,116
360	1,118	1,052	1,042	1,500
Valores médios	1,092	1,076	1,071	1,286

Tabela 21. Ratios glicose/umidade (G/U) obtidos nos testes T01 a T04 durante o armazenamento.

Tempo armazenamento (dias)	Ratio glicose/umidade			
	T01	T02	T03	T04
15	0,838	0,795	0,839	0,812
60	0,834	0,836	0,832	0,789
120	0,768	0,794	0,754	0,758
180	0,571	0,495	0,735	0,559
240	0,760	0,571	0,674	0,588
300	0,813	0,644	0,781	0,527
360	0,784	0,876	0,837	0,602
Valores médios	0,767	0,716	0,779	0,662

Méis com ratio frutose/glicose maiores que 1,3 apresentam tendência à cristalização vagarosa. Méis com ratio glicose/umidade abaixo de 1,7 não apresenta tendência de cristalização enquanto que méis com ratio entre 1,7 a 2,0 poderão cristalizar vagarosamente durante 12 meses e acima de 2,0, a cristalização ocorrerá rapidamente. Contudo, a cristalização depende também da quantidade de cristais, tratamento térmico e condições de armazenamento (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2014;RUOFF et al.,2006).

Visualmente, a cristalização foi observada somente nas amostras do teste T04 (não pasteurizado e mantido sob-refrigeração) após 60 e 365 dias de

armazenamento, conforme supracitado no item 5.3 (sólidos solúveis, página 76), de acordo com a Figura 28.

Conforme mostrado na Tabela 20, o ratio médio de frutose/glicose deste teste durante o período de armazenamento foi de 1,28, praticamente o valor indicativo da tendência a uma cristalização lenta (1,30). Aos 360 dias de vida de prateleira esse ratio foi de 1,5.



Figura 28. Presença de cristalização nos de frascos de méis dos testes T04 após 60 e 365 dias de armazenamento.

Em relação ao índice ART (açúcares redutores totais), de acordo com a Figura 29, foi observado que o teste T04 apresentou o maior valor médio durante o armazenamento em relação às demais amostras. O menor valor médio foi observado em amostras do teste T02 no mesmo tempo de avaliação. Até 150 dias de armazenamento, todos os testes apresentaram resultados similares e posteriormente foram observadas maiores variações.

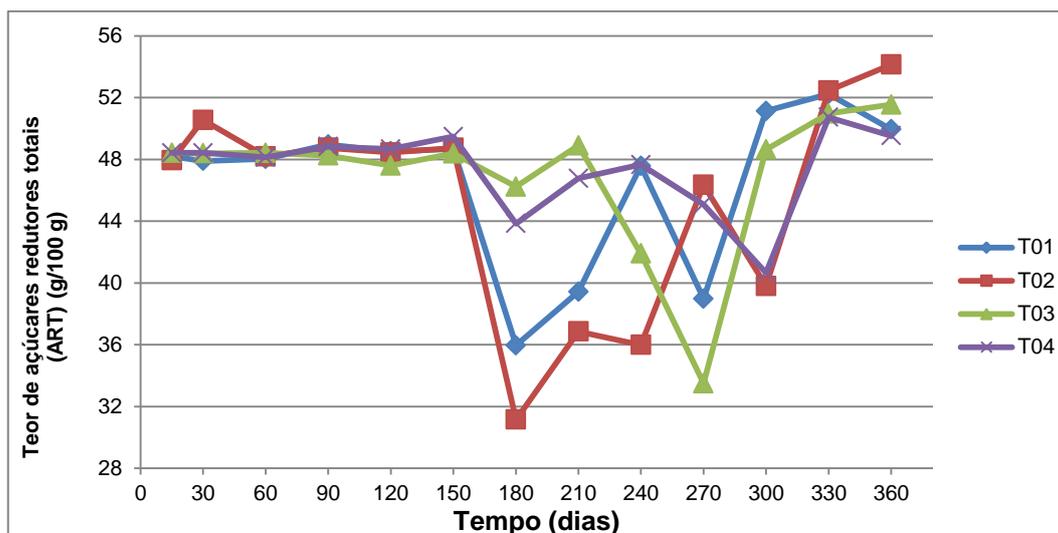


Figura 29. Teor de açúcares redutores totais (ART) presente nas amostras de méis nos testes T01 a T04 durante 1 ano.

O conteúdo de sacarose (Figura 30) é um importante parâmetro para a detecção de possíveis adulterações em mel. Na maioria das vezes, o teor elevado de sacarose pode indicar uma colheita prematura do mel, pois a sacarose ainda não foi transformada em glicose e frutose (ALVES et al.,2005;NASCIMENTO et al.,2015).

A sacarose no mel de abelhas nativas pode ser encontrada em baixos teores, desde o processo de maturação do mel em que é convertido em glicose e frutose (DIMINS et al.,2006).

Na legislação de méis de *A. mellifera* permite-se até 6 g/100 g. Todas as amostras avaliadas dos testes T01 a T04 apresentaram teores abaixo desse limite. Os resultados obtidos apresentaram variação até 150 dias durante o tempo de estocagem, sendo que, o teste T03 apresentou maior valor médio (0,580 g/100 g) e as amostras dos testes T02 foi obtida a menor média ao longo do armazenamento (0,442 g/100g).

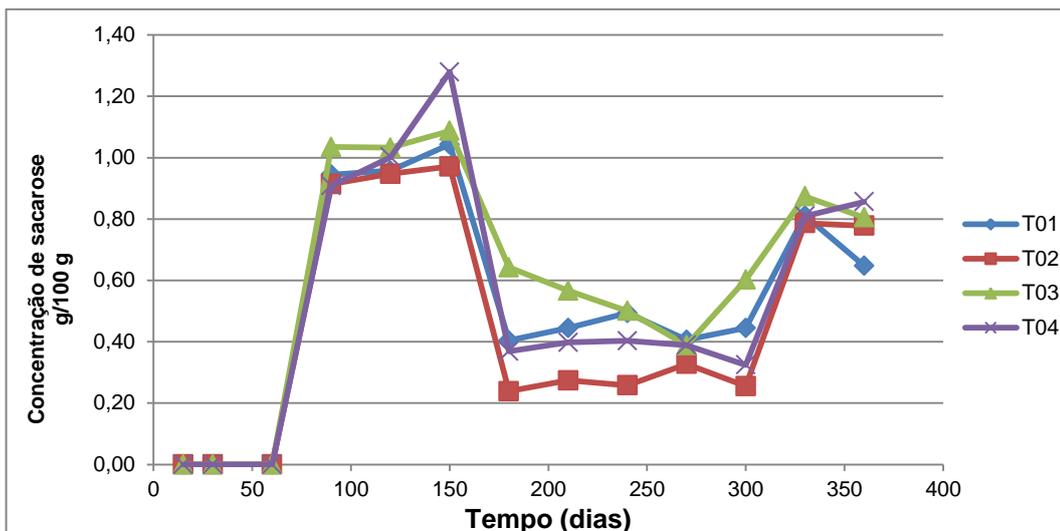


Figura 30. Concentração de sacarose nas amostras de mel presente nos testes T01 a T41 durante um ano de acompanhamento.

Foi observado no lote recém colhido (tempo 0) baixa presença de HMF, correspondente à $1,80 \pm 0,15$ mg/kg. Uma pequena quantidade de HMF é encontrada em méis recém colhidos, que pode ser justificado pela fração predominante de frutose, pois, teores elevados de glicose contribuem para o aumento na velocidade da reação de Maillard e consequentemente, influencia na formação de hidroximetilfurfural (ALVES et al.,2005;BILUCA et al.,2014).

Os teores de HMF nas amostras de méis dos testes T01 e T03 apresentaram comportamento similar ao longo de um ano de armazenamento, alcançando os valores máximos de 23,111 e 19,407 mg/kg respectivamente, conforme Figura 31.

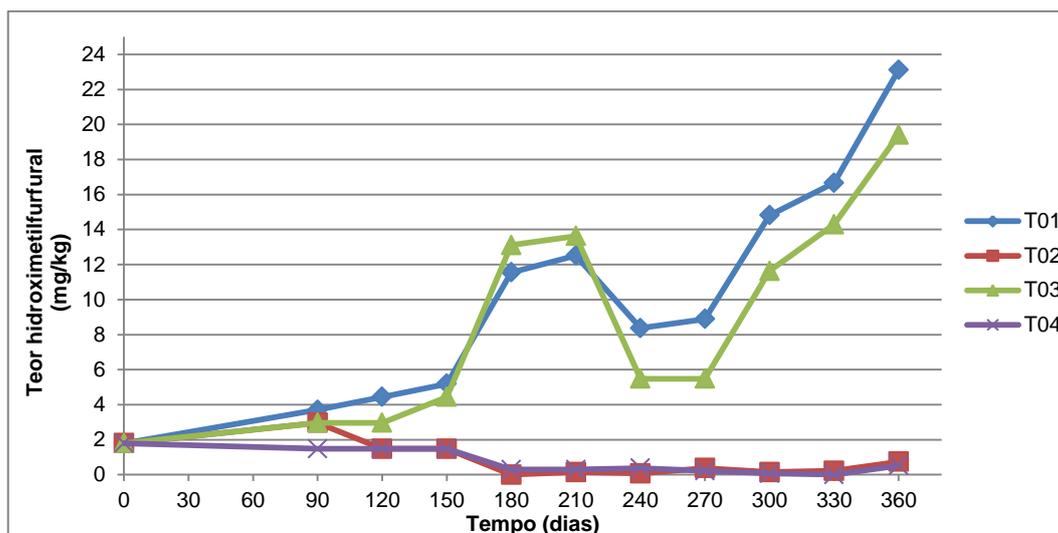


Figura 31. Teor de hidroximetilfurfural (mg/kg) em relação ao tempo de estocagem do mel dos testes T01 , T02, T03 e T04.

Os valores obtidos em todos os testes estão abaixo do valor máximo estabelecido pelas legislações nacional e internacional para mel de *A. mellifera* (máximo de 60 mg/kg) (BRASIL,2000).

Independentemente da aplicação da pasteurização, ambos os lotes mantidos à temperatura ambiente durante a estocagem (T01 e T03) mostraram que a temperatura de armazenamento foi um fator determinante para a formação de hidroximetilfurfural. Os lotes mantidos sob-refrigeração, testes T02 e T04, apresentaram menores teores de HMF em função do tempo, comprovando o efeito da temperatura de armazenamento sob a formação de HMF. Tal efeito corrobora com um estudo encontrado na literatura em que méis de *M. subnitida* foram mantidas durante 12 meses de estocagem em temperaturas de congelamento, refrigeração e ambiente. Neste estudo não foram encontradas diferenças estatísticas nos teores de HMF em amostras mantidas sob-refrigeração e congeladas. Ambos apresentaram baixos teores de HMF em relação às amostras mantidas à temperatura ambiente (ALMEIDA-MURADIAN et al.,2014).

Os resultados também mostraram que a pasteurização não foi um fator determinante na formação de HFM durante a estocagem. Estudo diverso defende que a pasteurização nas temperaturas de 100, 110, 120, 130, 140, 150 e 160°C na faixa de 20 a 100 segundos pode elevar o conteúdo de HMF no mel (TOSI et al.,2002). Porém constata-se neste estudo a aplicação de temperaturas excessivamente elevadas no tratamento térmico.

Teores de etanol foram detectados somente nas amostras do teste T03 (teor médio ao longo do armazenamento de 0,214 g/100g), confirmando a presença de leveduras (Figura 32) que desencadeiam processos fermentativos. A fermentação alcóolica em mel de abelha sem ferrão é realizada pelas leveduras osmofílicas, onde os açúcares são transformados em etanol e CO₂ (VIT et al.,2013;ZAMORA et al.,2006).

Acredita-se que o gênero *Zygosaccharomyces* tenha sido o responsável pela fermentação alcóolica neste lote em função da atividade de água resultante durante a estocagem e perfil metabólico verificado na literatura (fermentação de hexoses em etanol e dióxido de carbono e produção de metabólitos secundários como ácido acético, ésteres e glicerol) (BEVILACQUA et al.,2016;ZAMORA,2009).

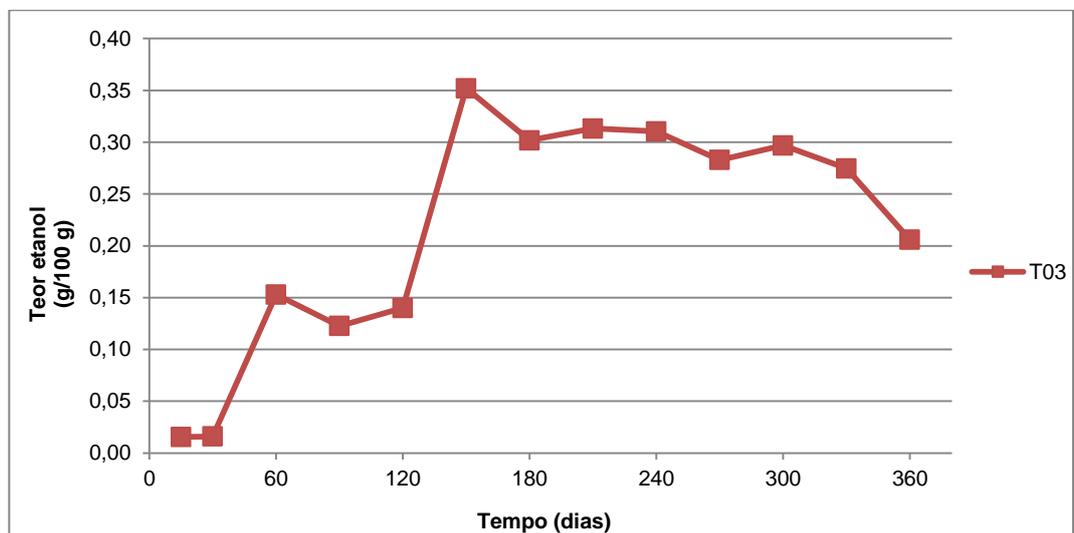


Figura 32. Teor de etanol (g/100 g) presente somente nos méis do teste T03.

5.4 Características microbiológicas dos méis durante a estocagem

Os resultados das análises microbiológicas referentes aos testes T01, T02, T03 e T04 encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22. Análises microbiológicas monitoradas durante 1 ano de armazenamento de amostras referentes aos testes T01 a T04.

Análises microbiológicas							
Teste	Tempo (dias)	<i>Salmonella spp</i> (25 g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Contagem de bolores (UFC/g)	Contagem de leveduras (UFC/g)	Contagem de leveduras osmofílicas (UFC/g)
Inicial	0	ausente	< 3	$1,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^1$	$1,4 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$
T01	15	-	-	$7,4 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	30	-	-	$9,0 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	60	-	-	$9,3 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	90	-	-	$7,2 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	120	-	-	$6,3 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	150	-	-	$5,5 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	180	ausente	< 3	$4,8 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	210	-	-	$6,5 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	240	-	-	$6,3 \times 10^4$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	270	-	-	$6,8 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	300	-	-	$1,1 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	330	-	-	$7,9 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	360	ausente	< 3	$5,4 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
T02	15	-	-	$1,1 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	30	-	-	$5,9 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	60	-	-	$6,5 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	90	-	-	$7,6 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	120	-	-	$1,1 \times 10^2$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	150	-	-	$9,5 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	180	ausente	< 3	$3,6 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	210	-	-	$1,1 \times 10^2$ a	$3,1 \times 10^2$	$<10^2$	$1,7 \times 10^2$
	240	-	-	$7,8 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	270	-	-	$7,9 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	300	-	-	$1,3 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	330	-	-	$5,5 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	360	ausente	<3	$5,1 \times 10^1$ a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$

Teste	Tempo (dias)	<i>Salmonella spp</i> (25 g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/g)	Contagem de bolores (UFC/g)	Contagem de leveduras (UFC/g)	Contagem de leveduras osmofílicas (UFC/g)
T03	15	-	-	$1,7 \times 10^2$	$9,0 \times 10^1$	$2,4 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$
	30	-	-	$9,5 \times 10^1$ ^a	$9,0 \times 10^1$	$2,7 \times 10^2$	$3,2 \times 10^3$
	60	-	-	$8,5 \times 10^1$ ^a	$<10^2$	$2,1 \times 10^4$	$4,9 \times 10^5$
	90	-	-	$7,7 \times 10^1$ ^a	$<10^2$	$6,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$
	120	-	-	$5,2 \times 10^1$ ^a	$<10^2$	$<10^2$	$6,3 \times 10^3$
	150	-	-	$1,2 \times 10^2$	$<10^2$	$1,8 \times 10^3$	$3,4 \times 10^5$
	180	ausente	< 3	$5,6 \times 10^1$ ^a	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	210	-	-	$4,9 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	240	-	-	$8,6 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	270	-	-	$5,2 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	300	-	-	$4,8 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	330	-	-	$8,9 \times 10^1$	$<10^2$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
	360	ausente	<3	$6,3 \times 10^1$ ^a	$<10^2$	$<10^2$	$1,5 \times 10^2$
T04	15	-	-	$3,3 \times 10^4$	$9,0 \times 10^1$	$4,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$
	30	-	-	$2,3 \times 10^4$	$9,0 \times 10^1$	$6,9 \times 10^2$	$1,8 \times 10^3$
	60	-	-	$1,2 \times 10^3$	$<10^2$	$3,3 \times 10^2$ ^a	$1,2 \times 10^3$
	90	-	-	$8,3 \times 10^1$	$<10^2$	$2,0 \times 10^2$ ^a	$7,7 \times 10^2$
	120	-	-	$7,1 \times 10^1$	$<10^2$	$<10^2$	$3,7 \times 10^2$
	150	-	-	$5,0 \times 10^1$ ^a	$<10^2$	$9,6 \times 10^1$ ^a	$9,0 \times 10^2$ ^a
	180	ausente	< 3	$7,3 \times 10^1$ ^a	$<10^2$	$1,3 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$ ^a
	210	-	-	$1,2 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$4,0 \times 10^2$ ^a
	240	-	-	$1,1 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$1,4 \times 10^2$ ^a
	270	-	-	$1,6 \times 10^2$ ^a	$<10^2$	$<10^2$	$9,7 \times 10^1$ ^a
	300	-	-	$1,3 \times 10^2$	$<10^2$	$1,2 \times 10^2$ ^a	$9,3 \times 10^1$ ^a
	330	-	-	$5,8 \times 10^1$ ^a	$<10^2$	$<10^2$	$1,8 \times 10^2$ ^a
	360	ausente	< 3	$1,2 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$1,6 \times 10^2$

UFC= Unidades formadoras de colônias.

^a Contagem estimada, abaixo do limite de quantificação do método.

Os micro-organismos necessitam de condições adequadas para sobrevivência e reprodução. Os fatores que apresentam maior impacto sobre o crescimento microbiano são a atividade de água, pH e temperatura (SILVA et al.,2010).

A partir deste pressuposto, nas condições médias de a_w (0,72-0,73) obtidas nos quatro tratamentos após um ano de estocagem, pode-se observar que as bactérias patogênicas que oferecem risco à saúde pública (*Salmonella spp.* e coliformes termotolerantes) não foram detectados nos tempos 0, 180 e 360 dias. Tais micro-organismos podem estar presentes no mel, entretanto estão inibidos pelas condições ambientais que afetaram seu desenvolvimento. Neste caso, a atividade de água observada ao longo de um ano foi determinante na segurança do produto avaliado (MENEZES et al.,2013).

Contudo, as condições médias de atividade de água (0,72-0,73) e pH (3,79-3,81) favorecem o crescimento de bolores e leveduras, principalmente o grupo das leveduras osmofílicas, em função do teor de açúcares.

Foi possível observar que após a pasteurização, os testes T01 e T02 apresentaram redução na carga inicial na contagem de mesófilos aeróbios de $1,8 \times 10^5$ UFC/g para $5,4 \times 10^1$ UFC/g e $5,1 \times 10^1$ UFC/g respectivamente. Esse resultado mostrou que o tratamento térmico foi efetivo para a redução de 4 ciclos log de mesófilos aeróbios nos testes T01 teste T02.

Foram constatadas reduções decimais na contagem de bolores nos tratamentos T01 e T02 de $1,0 \times 10^1$ para $<10^2$ UFC/g durante o armazenamento. Na contagem de leveduras, em ambos os testes durante um ano, foi observado que a pasteurização foi efetiva, sendo $1,4 \times 10^3$ UFC/g no recebimento da amostra de mel (tempo 0) para $<10^2$ UFC/g. Em relação às leveduras osmofílicas, o efeito do tratamento térmico aplicado ocasionou a redução de $3,4 \times 10^3$ UFC/g para $<10^2$ UFC/g no teste T01 e, no teste T02, todos os tempos avaliados apresentaram contagem de $<10^2$ UFC/g, exceto no tempo 210, com $1,7 \times 10^2$ UFC/g.

Salienta-se que a estabilidade obtida nos valores de contagem em $<10^2$ UFC/g durante o período de armazenamento pode ser um indicativo da ausência destes micro-organismos. Caso os valores estivessem na ordem de 10^2 UFC/g, essa contagem provavelmente aumentaria em função do tempo de armazenamento devido à proliferação da microbiota existente.

Ressalta-se que após 60 dias de armazenamento, foi necessário desrosquear as tampas metálicas de todos os frascos do tratamento T03 devido à formação de gás que causou um abaulamento na tampa, sendo rosqueados na sequência. Supõe-se que o gás produzido seja CO₂, já que na formação de etanol esse gás é produzido, e essa amostra foi a única que apresentou a presença de etanol nas análises de HPLC.

Além disso, o teste T03, lote não submetido ao tratamento térmico e mantido à temperatura ambiente no armazenamento, apresentou reduções de 3 ciclos log na contagem de aeróbios mesófilos (de $1,8 \times 10^5$ UFC/g para $1,7 \times 10^2$ UFC/g) durante o período de armazenamento. Com esse resultado, é possível pressupor que, devido ao desenvolvimento das leveduras osmofílicas e compostos formados durante a fermentação, ocorreu uma inibição no crescimento de mesófilos aeróbios. Outro fator limitante a esta população bacteriana refere-se também as condições de atividade de água, supracitado. Com relação à bolores, foi observado que após 15 dias de armazenamento, o crescimento manteve-se estável na ordem de 10^1 UFC/g. Já a atividade de leveduras variou ao longo do armazenamento de 10^2 a 10^4 UFC/g. A presença de leveduras osmofílicas foi constatada neste teste pois a população inicial permaneceu estável nos 30 dias de armazenamento e em seguida apresentou crescimento entre 60 e 150 dias. Posteriormente, a população demonstrou declínio em sua atividade para $<10^2$ UFC/g, com exceção da amostra analisada com 330 dias de armazenamento ($1,0 \times 10^5$ UFC/g).

No tratamento T04, lote não pasteurizado e mantido sob-refrigeração, a contagem de mesófilos aeróbios até 60 dias de armazenamento foi de $1,2 \times 10^3$ UFC/g. Nas análises posteriores, a população apresentou redução e manteve-se estagnada até o final do armazenamento. Este fato constatou que, a atividade de mesófilos aeróbios foi afetada pelo desenvolvimento de leveduras e leveduras osmofílicas. O crescimento de bolores manteve-se limitado a partir da amostra inicial, ou seja, as condições ambientais (refrigeração) inibiram seu desenvolvimento. Comportamento similar foi observado na contagem de leveduras durante o armazenamento. Entretanto, as leveduras osmofílicas apresentaram melhor desenvolvimento no teste T04. Sua atividade ótima ocorreu até 60 dias de armazenamento, na sequência, a contagem manteve-se limitada, provavelmente em função da temperatura de refrigeração. Vale ressaltar que, a manutenção das

propriedades do mel na temperatura de refrigeração é dependente da carga microbiana inicial, pois conforme comentado no item 3.4.4, baixas temperaturas não eliminam os micro-organismos presentes, apenas retardam seu desenvolvimento. A indicação da refrigeração em mel de abelhas sem ferrão deve ser efetuada com cautela pelo meliponicultor, já que as Boas Práticas de Fabricação também devem estar aliadas às práticas de manejo.

6 CONCLUSÕES

Os parâmetros de atividade de água e pH do mel de abelhas nativas impedem o desenvolvimento de bactérias patogênicas, entretanto oferecem ótimas condições para a atividade de leveduras osmofílicas, em função do teor de açúcares presentes no mel. Dado o exposto, metade de um lote de mel de *M. mondury* foi submetido à pasteurização e mantido em duas condições de estocagem: temperatura ambiente (T01) e de refrigeração (T02) e comparado com outra parte do mesmo lote não pasteurizado e mantido nas mesmas condições de temperaturas: à temperatura ambiente (T03) e refrigerado (T04).

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento térmico realizado nos testes T01 e T02, foi efetivo nas condições aplicadas para os micro-organismos deteriorantes alvos não esporulados (*Z. bailli* e *rouxii*). Não foram observadas importantes alterações nas análises físico-químicas realizadas durante um ano de estocagem nos testes T01 a T04 (pH=3,66 a 4,23 e a_w =0,703 a 0,757). A manutenção do mel de *M. mondury* à temperatura ambiente (teste T03) permitiu o desenvolvimento de leveduras osmofílicas e a fermentação alcóolica foi identificada neste lote através da produção de gás (possivelmente, dióxido de carbono) e de etanol, metabólitos produzidos por micro-organismos do gênero *Zygosaccharomyces*.

As análises microbiológicas indicaram que no lote referente ao teste T04 as leveduras osmofílicas foram inibidas pela temperatura de refrigeração. Esse lote foi o único a apresentar cristalização durante a vida de prateleira.

Pela observação dos aspectos analisados, a aplicação de um método de conservação, especialmente, a pasteurização, controlando-se os binômios tempo/temperatura em conjunto com as Boas Práticas de Fabricação, é recomendada aos meliponicultores para a obtenção de um produto seguro do ponto de vista de saúde pública e estável a temperatura ambiente. Dentre os principais benefícios do tratamento térmico do mel incluem a eliminação de micro-organismos deteriorantes e a possibilidade do armazenamento à temperatura ambiente, sem alterações em suas características físico-químicas durante a vida de prateleira de 1 ano.

A utilização da refrigeração é relevante para a inibição de reações de deterioração no produto. Porém esse estudo indica que se refrigeração for utilizada

sem a pasteurização prévia, o mel tende a sofrer cristalização durante o armazenamento. A manutenção do produto em temperatura ambiente (T03) indicou o desenvolvimento de um processo fermentativo no mel, constatado pela produção de etanol nas amostras avaliadas.

Independente do método de conservação aplicado, é salutar os procedimentos de boas práticas durante coleta e armazenamento do mel para evitar a contaminação do produto durante seu manuseio.

O desenvolvimento de uma regulamentação específica para o mel de abelhas nativas é crucial para sua comercialização adequada, para a detecção de possíveis adulterações e possibilitar que seja requerida a utilização de Boas Práticas de Manipulação (BPF) do produto.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Aliado aos estudos realizados neste presente trabalho, seria de grande valia a análise sensorial de amostras de mel de *M. mondury*, para a correlação às análises de caracterização físico-químicas.

Faz-se necessário também a comparação de técnicas cromatográficas para a obtenção de resultados mais precisos e específicos aos analitos em estudo, como realização de testes em diferentes colunas ou utilização de diferentes detectores como, o IR para análises em açúcares e o UV para detecção de ácidos orgânicos.

Na caracterização microbiológica, a identificação da levedura osmofílica de maior predominância no mel seria útil para obtenção de um estudo bioquímico de sua atividade durante o armazenamento.

8 REFERÊNCIAS

AHMED, M.; DJEBLI, N.; AISSAT, S.; KHIATI, B.; MESLEM, A.; BACHA, S. In vitro activity of natural honey alone and in combination with curcuma starch against *Rhodotorula mucilaginosa* in correlation with bioactive compounds and diastase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3, n.10, p.816-821, 2013.

AIDAR, D. S. **A Mandaçaia**. Série monografias Ribeirão Preto:. Editora FUNPEC, 1996. v.4, 19 pp.

ALMEIDA-MURADIAN, L. *Tetragonisca angustula* Pot-Honey Compared to *Apis mellifera* Honey from Brazil. In: P. Vit, et al. **Pot-Honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. p.376-382.

ALMEIDA-MURADIAN, L.; MATSUDA, A. Physicochemical parameters of amazona Melipona honey. **Química Nova**, v.30, n.3, p.707-708, 2007.

ALMEIDA-MURADIAN, L.; STRAMM, K.; HORITA, A.; BARTH, O.; FREITAS, A.; ESTEVINHO, L. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science & Technology**, v.48, p.1698-1706, 2013.

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

ALVES, E.; FONSECA, A.; SANTOS, P. d.; BITENCOURT, R.; SODRÉ, G. d. S.; CARVALHO, C. A. L. d. Estabilidade físico-química e sensorial de méis desumidificados de *Tetragonisca angustula*. **Magistra**, v.24, p.185-193, 2012.

ALVES, R. M. d. O.; CARVALHO, C. A. L. d.; SOUZA, B. d. A.; SODRÉ, G. d. S.; 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. d. A.; SOUZA, B. d. A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. d. C. C. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula latreille*, 1811) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.535-541, 2009.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemist, Washington, 2006.

---. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists, Washington, 2010. p.1094

---. **Official Method 2003.09 (Salmonella PCR Bax System)**. Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, Maryland, 2012. Chapter 17. p.205-210.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.; FONTANA, A.; SCHMIDT, S.; LABUZA, T. **Water activity in Foods: fundamentals and applications**. Iowa. Blackwell Publishing, 2007. 435p.
BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. **The Microbiological Quality of Food**. 1.ed., Elsevier, 2016.

BIJLSMA, L.; BRUIJN, L. L. M. d.; MARTENS, E. P.; SOMMEIJER, M. J. Water content of stingless bee honeys (Apidae, Meliponini): interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**, v.37, n.4, p.480-486, 2006.

BILUCA, F.; BETTA, F. D.; OLIVEIRA, G. P. d.; PEREIRA, L. M.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v.159, p.244-249, 9/15/, 2014.

BILUCA, F. C. **Caracterização química e influência do tratamento térmico em méis de abelha sem ferrão (*Meliponinae spp.*) produzidos no estado de Santa Catarina.** 2014. 110p. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

BIO-RAD Bio-Rad Laboratories Inc., Chromatography Aminex HPLC Columns. USA. p.4, 2016. Disponível em:<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6333.pdf>. Acesso em: 27 dez 2016.

BLACK, D. G.; BARACH, J. T. **Canned Foods: Principles of thermal process control acidification and container closure evaluation.** 8.ed., Washington. Grocery Manufacture Association (GMA), 2015.

BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. **Yeasts in Food.** CRC, 2003.

BOGDANOV, S. **Harmonized Methods of the International Honey Commission.** Swiss Bee Research Centre, Bern, Switzerland, 2002. Disponível em:<<http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2017.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000: Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel.** Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2000. p.23.

---. **Resolução n.346, de 06 de julho de 2004, Disciplina a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários.** Ministério do Meio Ambiente, CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2004. p.2.

BUENO, J. F. **Sistema automatizado de classificação de abelhas baseado em reconhecimento de padrões.** 2010. 176p. Escola Politécnica Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

CABRERA, V. M. S.; SÁNCHEZ, A.; CESAR, A. T. Stability of temperature, relative humidity and dew point inside *Melipona eburnea* (Apidae: Meliponini) colonies. **Revista Ciências Agropecuárias**, v.1, n.1, p.62-71, 2015.

CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R. Produção de mel: Embrapa Meio Norte, sistemas de produção. Embrapa Meio Norte, v.3, 2002. Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80709/1/sistemaproducao-3.PDF>>. Acesso em: 13 dez 2016.

CAMARGO, R. C. R. d.; OLIVEIRA, K. L. d.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.20, 2017.

CAMPOS, F. S.; GOIS, G. C.; CARNEIRO, G. G. Parâmetros Físico-Químicos do Mel de Abelhas *Melipona scutellaris* Produzido no Estado da Paraíba. **Zootenia**, v.7, p.186-190, 2010.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, n.4, p.793-810, 2011.

CARVALHO, C. A. L.; SODRÉ, G. S.; FONSECA, A. A. O.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; CLARTON, L. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.81, n.1, p.143-149, 2009.

CHUA, L. S.; ADNAN, N. A.; ABDUL-RAHAMAN, N. L.; SARMIDI, M. R. Effect of thermal treatment on the biochemical composition of tropical honey samples. **International Food Research Journal**, v.21, n.2, p.773-778, 2014.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. Effects of long term storage on stingless bee (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) honey. **Journal of Apicultural Research**, v.54, n.5, p.441-451, 2015/10/20, 2015. ISSN:0021-8839.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM; BURGETT, M. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v.192, p.149-155, 2/1/, 2016. ISSN:0308-8146.

CODEX Alimentarius Commission. Codex Standard for Honey - CODEX STAN 12-1981. Rome, FAO, 2001. p.8.

CONTRERA, F.; MENEZES, C.; VENTURIERI, G. New horizons on stingless beekeeping (Apidae, Meliponini). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.48-51, 2011.

CRANE, E. **O livro do mel**. São Paulo. Editora Nobel, 1983.

CUI, Z.; SUN, L.; CHEN, W.; SUN, D.-W. Preparation of dry honey by microwave–vacuum dry. **Journal of Food Engineering**, v.84, p.582-590, 2008.

CUNHA, M. C. C. **Métodos numéricos**. 2.ed., Editora Unicamp, 2003.

DARDÓN, M. J.; MALDONADO-AGUILERA, C.; ENRÍQUEZ, E. The Pot-Honey of Guatemalan Bees. In: P. Vit, et al. **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013. p.395-408.

DECAGON Aqualab Dew Point Water Activity Meter 4TE. Decagon Devices, Inc., Pullman. 2016. Disponível em:<<http://www.aqualab.com/products/water-activity-meters/aqualab-dew-point-water-activity-meter-4te/>>. Acesso em: 10 dez 2016.

DIAS, S.; VAGHETTI, J.; E. LIMA, E.; BRASIL, J.; PAVAN, F. **Química Analítica: teoria e prática essenciais**. Porto Alegre. Bookman, 2016.

DIMINS, F.; KUKA, P.; KUKA, M.; CAKSTE, I. The criteria of honey quality and its changes during storage and thermal treatment. **Raksti**, v.16, n.311, p.73-78, 2006.

DOWNES, F.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed., American Public Health Association, 2001.

DRUMMOND, M. S. Maturação do mel de abelhas nativas sem ferrão: novo panorama de consumo no mercado gastronômico. In: Congresso Iberoamericano de Apicultura, 10, 2010. Disponível em:<<http://www.xibla.com.br/PDF/Murilo%20Drummond%27.pdf> >. Acesso em: 14 out 2016.

DUARTE, A. W. F.; DOS SANTOS VASCONCELOS, M. R.; DE MENEZES, A. P. D.; DA SILVA, S. C.; ODA-SOUZA, M.; LÓPEZ, A. M. Q. Composition and antioxidant activity of honey from Africanized and stingless bees in Alagoas (Brazil): a multivariate analysis. **Journal of Apicultural Research**, v.51, n.1, p.23-35, 2012/01/01, 2012.

EUA. **Honey: A reference guide to nature's sweetener**, Colorado: **National Honey Board**. National Honey Board, 2005. Disponível em:<<http://www.honey.com/tools-tips-and-resources/honey-a-reference-guide-to-natures-sweetener>>. Acesso em: 13 set 2016.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática**. 2.ed., Artmed, 2006. 602p.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. I. **Química De Alimentos De Fennema**. Artmed, 2010.

FORSYTHE, S. **The microbiology of safe food**. Wiley-Blackwell, 2010.

FRANCO, B.; LANGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo. Ed. Atheneu, 2002.

FUENMAYOR, C. A.; DÍAZ-MORENO, A. C.; ZULUAGA-DOMÍNGUEZ, C. M.; QUICAZÁN, M. C. Honey of Colombian Stingless Bees: Nutritional Characteristics and Physicochemical Quality Indicators. In: P. Vit, et al. **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. Springer, 2013. p.654.

GHELDOLF, N.; ENGESETH, N. J. **Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples**. Washington, DC, ETATS-UNIS. American Chemical Society, 2002. v.50,

GOIS, G.; LIMA, C.; SILVA, L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A. Composição do mel de *Apis mellifera*: Requisitos de Qualidade. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.137-147, 2013.

GONNET, M.; LAVIE, P. La pasteurization des miels. **Annals of Abeilles**, v.7, p.81-102, 1964.

GUERRINI, A.; BRUNI, R.; MAIETTI, S.; POLI, F.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; SCALVENZI, L.; SACCHETTI, G. **Food Chemistry**. 2009. 1413p.

GUO, W.; LIU, Y.; ZHU, X.; WANG, S. Temperature-dependent dielectric properties of honey associated with dielectric heating. **Journal of Food Engineering**, v.102, n.3, p.209-216, 2011.

HOLANDA, C. A.; OLIVEIRA, A. R.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. d. S.; SOUZA, J. L.; ARAÚJO, M. J. A. M. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata Smith* da região do cerrado maranhense. **Química Nova**, v.35, p.55-58, 2012.

IFTPS. **Guidelines for Conducting Thermal Processing Studies**. Institute For Thermal Processing Specialists Guelph, 2014. Disponível

em:<http://www.iftps.org/pdf/guidelines/Retort_Processing_Guidelines_02_13_14.pdf
. >. Acesso em: 20 fev 2016.

ISO. **Microbiology of food and animal stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presuntive *Escherischia coli* - most probable number tecnique.** The International Organization for Standardization, 2005.

---. **ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*** The International Organization for Standardization, 2007.

JARDIM, I.; COLLINS, C.; GUIMARÃES, L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: C. Collins, et al. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora Unicamp, 2014. p.273-398.

JIMENEZ, M.; BERISTAIN, C. I.; AZUARA, E.; MENDOZA, M. R.; PASCUAL, L. A. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. **Journal of Apicultural Research**, v.55, n.2, p.151-160, 2016/03/01, 2016. ISSN:0021-8839.

KAREL, M.; LUND, D. B. **Physical Principles of Food Preservation: Revised and Expanded.** 2.ed., CRC Press, 2003.

KHAN, Z. S.; NANDA, V.; BHAT, M. S.; KHAN, A. Kinetic Studies of HMF Formation and Diastase Activity in Two Different Honeys of Kashmir. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.4, p.97-106, 2015.

KORNACKI, J. K. Processing plant investigations: practical approaches to determining sources of persistent bacterial strains in the industrial food processing environment. In: B. G. JOSHUA, et al. **The microbiological safety of low water activity foods and spices.** New York: Springer, 2014. p.69.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a taxonomic study**. 5.ed., 2011.

LABROPOLUS, A.; ANESTIS, S. Sweeteners: nutritional aspects, applications and production technology. In: T. VARZAKAS, et al. **Sweeteners: nutritional aspects, applications and production technology**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p.119-126.

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

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: B. Franco. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu, 2004. p.13-16.

MALIKA, N.; MOHAMED, F.; CHAKIB, E. A. Microbiological and Physico-Chemical Properties of Moroccan Honey. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.07, n.5, p.773-776, 2005.

MARTH, E. Extended shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. **Food Technology**, v.52, n.2, p.57-62, 1998.

MELO, Z.; DUARTE, M. E.; MATA, M. Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, n.1, p.89-99, 2003.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F. A. F. L.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. In: P. Vit, et al. **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. Springer, 2013.

MERCOSUL. **MERCOSUL/GMC/RES. Nº 89/99: Regulamento Técnico Mercosul "Identidade e Qualidade do Mel"**. Montevideu, 1999. p.6.

MICHENER, C. D. The Meliponini. In: P. Vit, et al. **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. Springer, 2013. p.3-17.

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

MOURA, S. G. d. **Qualidade do mel de abelhas (*Apis mellifera* L.) em função do ambiente e do tempo de armazenamento**. 2006. 64p. Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2006.

NASCIMENTO, A. S. d.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. d.; ARAÚJO, D. F. D.; OLINDA, R. A. d.; SILVEIRA, T. A. d. Physical-Chemical Parameters of Honey of Stingless Bee (Hymenoptera: Apidae). **American Chemical Science Journal**, v.7, n.3, p.139-149, 2015.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão** São Paulo. Editora Nogueirapis, 1997.

OLIVEIRA, E.; SANTOS, D. Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.70, n.2, p.7, 2011.

OLIVEIRA, F.; OLIVEIRA, J. **Processing Foods: quality optimization and process assessment**. CRC Press, 1999.

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

OLIVEIRA, P. S.; MÜLLER, R. C. S.; DANTAS, K. d. G. F.; ALVES, C. N.; VASCONCELOS, M. A. M. d.; VENTURIERI, G. C. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v.35, p.1728-1732, 2012.

PASSAMANI, L. **Estudo das características físicas, químicas e microbiológicas de compostos de mel produzidos no estado do Rio de Janeiro**. 2005. Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2005.

PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v.61, n.4, p.348-354, 2014.

PÉREZ-PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ-MALAVAR, A.; VIT, P. Efecto de la Fermentación Postcosecha en la Capacidad Antioxidante de Miel de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811. **Revista Biotecnología** v.11, n.1, p.14-20, 2007.

PITT, J.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3.ed., London. Springer, 2009.

POTTER, N.; HOTCHKISS, J. Heat preservation and processing. In: N. POTTEReJ. HOTCHKISS. **Food Science: Fifth Edition**. New York: Springer, 1995. p.139-156.

PRAKASH, V.; MARTIN-BELLOSO, O.; KEENER, L.; ASTLEY, S. B.; BRAUN, S.; MCMAHON, H.; LELIEVELD, H. **Regulating safety of traditional and ethnic foods**. 1.ed., Oxford. Elsevier, 2016.

PUCCIARELLI, A. B.; SCHAPOVALOFF, M. E.; KUMMRITZ, S.; SENUK, I. A.; BRUMOVSKY, L. A.; DALLAGNOL, A. M. Microbiological and physicochemical analysis of yatei (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. **Revista Argentina de Microbiología**, v.46, n.4, p.325-32, 2014. *Revista Argentina de Microbiología*.

QUAST, D. G. **Cálculo da intensidade de esterilização e de cozimento de alimento**. Instruções Técnicas - N° 10. Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, 1976. 59p.

RAHMAN, M. **Handbook of food preservation**. CRC Press, 2007.

RICHARDSON, P. **Improving the thermal processing of foods** Food Control. Boca Rato, FL. CRC Press, 2004. 507p.

RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba. Barros & Marques 2004.

ROSA, C. A.; PÉTER, G. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. The Yeast Handbook. Elsevier, 2006.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology **Apidologie**, v.37, n.2, p.124-143, 2006.

RUOFF, K.; IGLESIAS, M. T.; LUGINBÜHL, W.; BOSSET, J.-O.; BOGDANOV, S.; AMADÒ, R. Quantitative analysis of physical and chemical measurands in honey by mid-infrared spectrometry. **European Food Research and Technology**, v.223, n.1, p.22-29, 2006. ISSN:1438-2385.

SAK-BOSNAR, M.; SAKAČ, N. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. **Food Chemistry**, v.135, n.2, p.827-831, 2012.

SEMKIW, P.; SKOWRONEK, W.; SKUBIDA, P.; CHMIELEWSKA, H.; SZCZESNA, T. Changes occurring in honey during ripening under controlled conditions based on α -amylase activity, acidity and 5-hydroxymethylfurfural content. **Journal of Apicultural Science**, v.54, n.1, p.55-64, 2010.

SEREIA, M. J.; ALVES, E. M.; TOLEDO, V. d. A. A. d.; MARCHINI, L. C.; FAQUINELLO, P.; SEKINE, E. S.; WIELEWSKI, P. Microbial flora in organic honey

samples of africanized honeybees from Parana river islands. **Food Science and Technology (Campinas)**, v.31, p.462-466, 2011.

SILVA, F. V. d. **Comparação do desempenho de um sistema de refrigeração para resfriamento de líquido controlado a diferentes modos de controle.** 2003. 327p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.

SILVA, G. S. d. **Avaliação dos parâmetros químicos e potencial antioxidante do mel de jandaíra (*Melipona subnitida* D.)** 2011. Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

SILVA, I. d.; TANIA DA SILVA; CAMARA, C.; QUEIROZ, N.; MAGNANI, M.; NOVAIS, J. d.; SOLEDADE, L. E.; LIMA, E.; SOUZA, A. L. d.; SOUZA, A. G. d. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v.141, n.4, p.3552-3558, 2013a.

SILVA, M. C. D. P. **Caracterização físico-química, teor de antioxidante e perfil sensorial de méis de abelhas submetidos à desumidificação e umidificação.** 2015. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. d.; GOMES, R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 4.ed., São Paulo. Varela, 2010.

SILVA, R.; MONTEIRO, V.; ALCANFOR, J.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Food Science and Technology (Campinas)**, v.23, p.337-341, 2003.

SILVA, T. M. S.; DOS SANTOS, F. P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; DA SILVA, E. M. S.; DA SILVA, G. S.; DE NOVAIS, J. S.; DOS SANTOS, F. d. A. R.; CAMARA, C. A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and

antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.29, n.1, p.10-18, 2013b.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. d. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v.10, n.3, p.146-152, 2012.

SINGH, N.; SINGH, S. J.; BAWA, A. S.; SEKHON, K. S. **Honey its food uses**. Indian Food Packer. India Food Preservers Association, v.42, 15-25p. 1988.

SINGH, R.; HELDMAN, D. **Introduction to food engineering**. 4.ed., Elsevier, 2009.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica latreille, 1807* (hymenoptera, apidae, meliponini)**. 2012. 87p. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Rio Claro, 2012.

SODRE, G.; CARVALHO, C.; FONSECA, A.; ALVES, R.; SOUZA, B. Perfil sensorial e aceitabilidade de méis de abelhas sem ferrão submetidos a processos de conservação **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.72-77, 2008.

SOUSA, J.; SOUZA, E.; MARQUES, G.; BENASSI, M.; 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**, v.65, p.645-651, 2016.

SOUZA, B.; ROUBIK, D.; BARTH, O.; HEARD, T.; ENRÍQUEZ, E.; CARVALHO, C.; VILLAS-BÔAS, J.; MARCHINI, L.; LOCATELLI, J.; PERSANO-ODDO, L.; ALMEIDA-MURADIAN, L.; BOGDANOV, S.; VIT, P. Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. **Interciencia**, v.31, p.867-875, 2006.

SOUZA, B.; MARCHINI, L.; DIAS, C.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C.; ALVES, R. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do

Estado da Bahia. **Food Science and Technology (Campinas)**, v.29, p.798-802, 2009.

SOUZA, R. C. D. S.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; OLIVEIRA, F. P. M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazonica**, v.32, n.2, p.333-336, 2004.

STATSOFT Statsoft, software version 13.1. Dell, Tulsa. 2016. Acesso em: 20 out 2016

STUMBO, C. F. **Thermobacteriology in food processing**. 2.ed., New York. Academic Press, 1973.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Controle do crescimento microbiano. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

TOSI, E.; CIAPPINI, M.; RÉ, E.; LUCERO, H. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. **Food Chemistry**, v.77, n.1, p.71-74, 2002.

TOSI, E. A.; RÉ, E.; LUCERO, H.; BULACIO, L. Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. **LWT - Food Science and Technology**, v.37, n.6, p.669-678, 9//, 2004.

TUCKER, G. Pasteurization: Principles and Applications. In: B. CABALLERO, et al. **Encyclopedia of food and health**. Oxford: Elsevier, 2016. p.264-269.

VENTURIERI, G. C. Criação de abelhas indígenas sem ferrão. Embrapa Amazônia Oriental, Belém. p.60, 2008. Disponível

em:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/410121/1/livroabelha2014.pdf>>. Acesso em: 25 fev 2017.

VENTURIERI, G. C.; OLIVEIRA, P. S.; VASCONCELOS, M. A. M. d.; MATTIETTO, R. d. A. Caracterização, Colheita, Conservação e Embalagem de Méis de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. v.52, 2007. Acesso em: 16 ago 2016.

VÉRAS, S. d. O. **Parâmetros de diferenciação dos méis dos principais grupos de abelhas criadas para a produção de mel na Bahia.** 2012. 58p. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2012.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão.** Série Manual Tecnológico. 1a.ed., Brasília. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012. Disponível em:<http://www.ispn.org.br/arquivos/mel008_31.pdf>. Acesso em: 10 ago 2016.

VIT, P.; BOGDANOV, S.; KILCHENMANN, V. Composition of Venezuelan honeys from stingless bees (Apidae: Meliponinae) and *Apis mellifera* L. **Apidologie**, v.25, n.3, p.278-288, 1994.

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. **Pot honey: a legacy of stingless bees.** 113p, 2013.

WITTER, S.; NUNES-SILVA, P. **Manual de Boas Práticas para o manejo e conservação de abelhas nativas (meliponíneos).** 1.ed., Porto Alegre. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2014. 141p.

YADATA, D. Detection of the Electrical Conductivity and Acidity of Honey from Different Areas of Tepi. **Food Science and Technology**, v.2, n.5, p.59-63, 2014.

YANNIOTIS, S.; SUNDÉN, B. **Heat Transfer in Food Processing: Recent developments and applications.** Wit Press, 2007.

ZAMORA, F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: M. V. Moreno-ArribaseM. C. Polo. **Wine Chemistry and Biochemistry.** Springer, 2009. p.3-26.

ZAMORA, M. C.; CHIRIFE, J.; ROLDÁN, D. On the nature of the relationship between water activity and % moisture in honey. **Food Control**, v.17, n.8, p.642-647, 2006.

9 APÊNDICE

APÊNDICE A - Resultados das análises realizadas em HPLC, expressos em g/L, recebidos pelo laboratório responsável pelas análises.

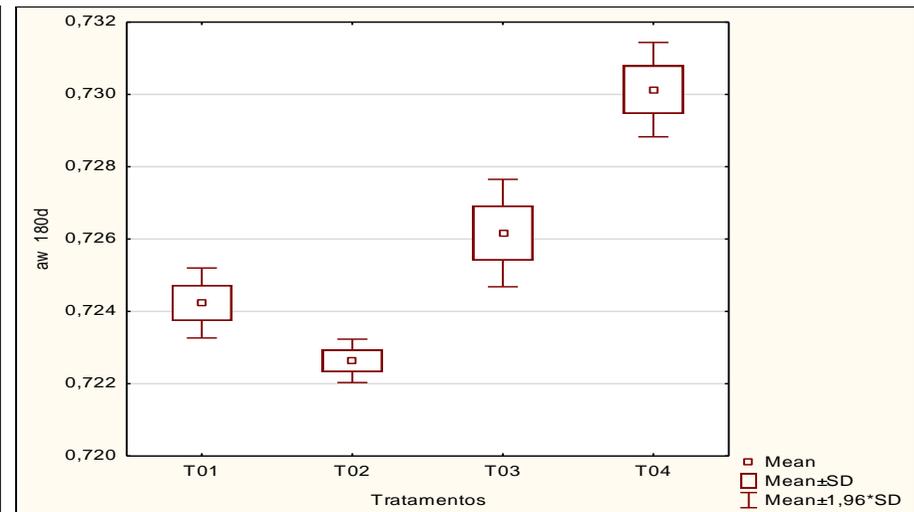
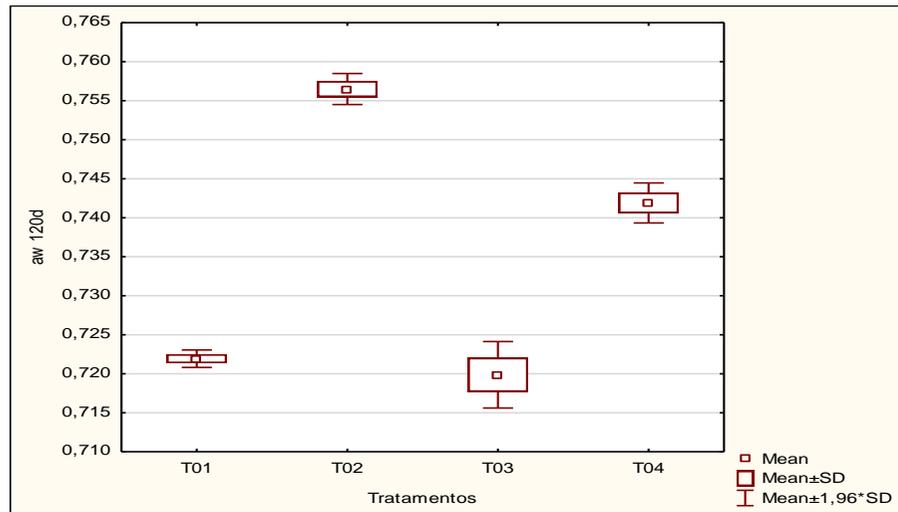
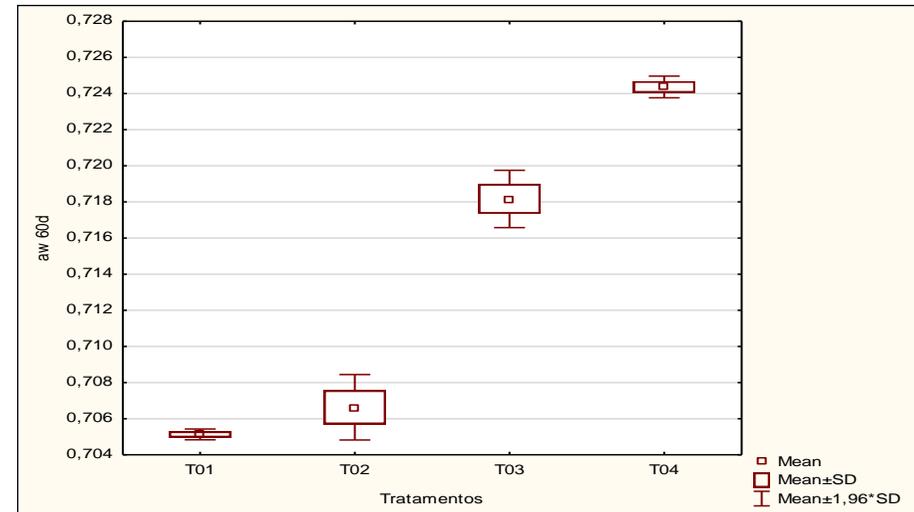
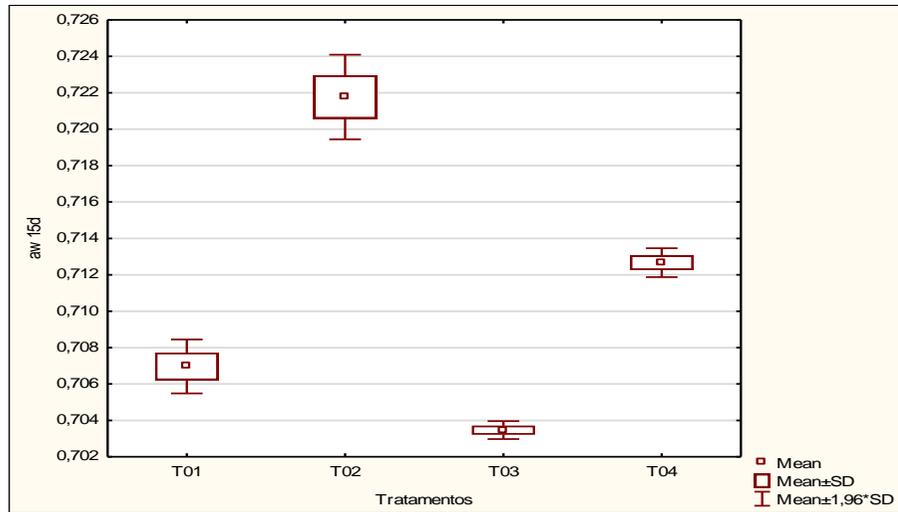
Amostra	Dias	Ácido Acético g/L	Ácido Láctico g/L	Frutose g/L	Glicose g/L	Sacarose g/L	Etanol g/L	HMF g/L
Inicial	0	0,7340	0,4870	328,898	319,8820	0,000	0,2060	0,0018
T01	15	0,6800	0,4490	330,362	320,5190	0,000	0,0000	**
	30	0,6810	0,4660	328,808	317,8860	0,000	0,0000	**
	60	0,6560	0,4550	329,415	319,0840	0,000	0,0000	**
	90	0,3280	0,3340	338,786	308,7860	12,754	0,0000	0,0050
	120	0,2710	0,2860	337,480	303,9980	12,931	0,0000	0,0060
	150	0,6260	0,6420	338,693	303,7500	14,083	0,0000	0,0070
	180	0,3270	0,6890	253,683	226,0530	5,458	0,0000	0,0156
	210	0,3440	0,7240	277,731	248,3630	6,001	0,0000	0,0169
	240	0,4710	0,8740	334,471	300,8970	6,663	0,0000	0,0113
	270	0,4270	0,8616	274,429	245,9770	5,485	0,0000	0,0120
	300	0,5470	1,1080	361,893	322,0870	6,002	0,0000	0,2000
	330	0,5710	0,3440	358,787	334,789	10,951	0,0000	0,0225
360	0,5890	0,7230	351,158	313,980	8,744	0,0000	0,0312	
T02	15	0,7470	0,4880	328,715	318,5390	0,000	0,0000	**
	30	0,6810	0,4320	346,112	336,4120	0,000	0,0000	**
	60	0,6490	0,4230	330,973	319,6900	0,000	0,0000	**
	90	0,3130	0,3340	338,320	306,7680	12,335	0,0000	0,0040
	120	0,3050	0,2980	336,858	303,7330	12,790	0,0000	0,0020
	150	0,7350	0,6680	338,026	306,2220	13,112	0,0000	0,0020
	180	0,3810	0,7650	218,993	198,2400	3,225	0,0000	0,0000
	210	0,4350	0,8710	259,220	234,4900	3,703	0,0000	0,0002
	240	0,3460	0,6820	253,376	228,8920	3,486	0,0000	0,0001
	270	0,5750	1,0470	323,493	297,5230	4,422	0,0000	0,0005
	300	0,4470	0,8660	278,992	254,8190	3,450	0,0000	0,0002
	330	0,4890	0,5750	353,215	343,799	10,620	0,0000	0,0003
360	0,6430	0,7480	369,042	350,839	10,504	0,0000	0,0010	

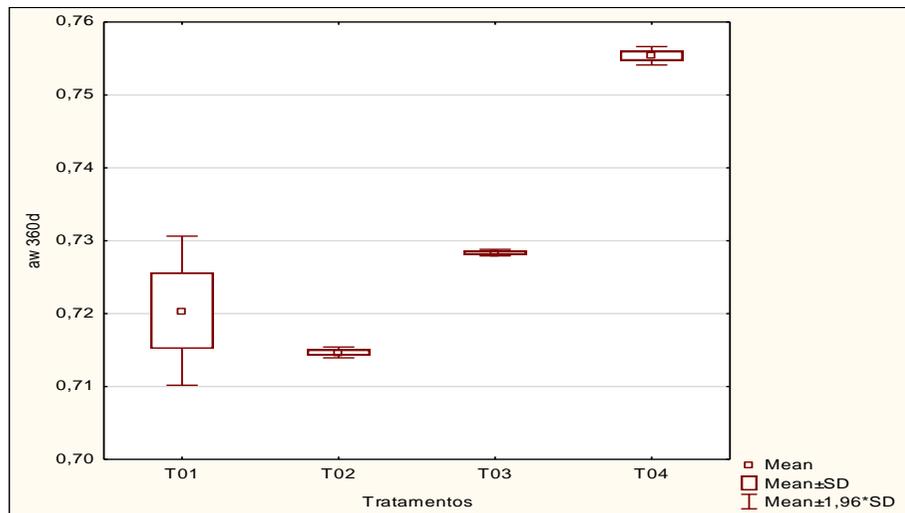
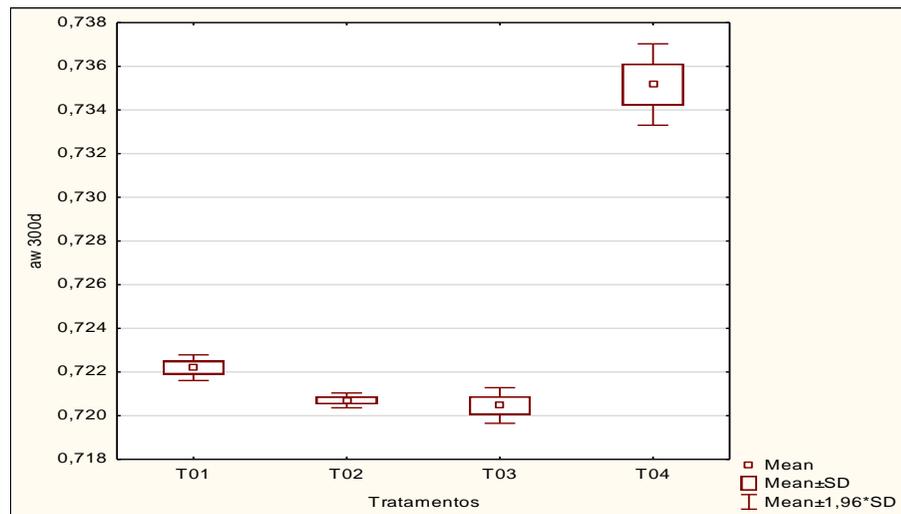
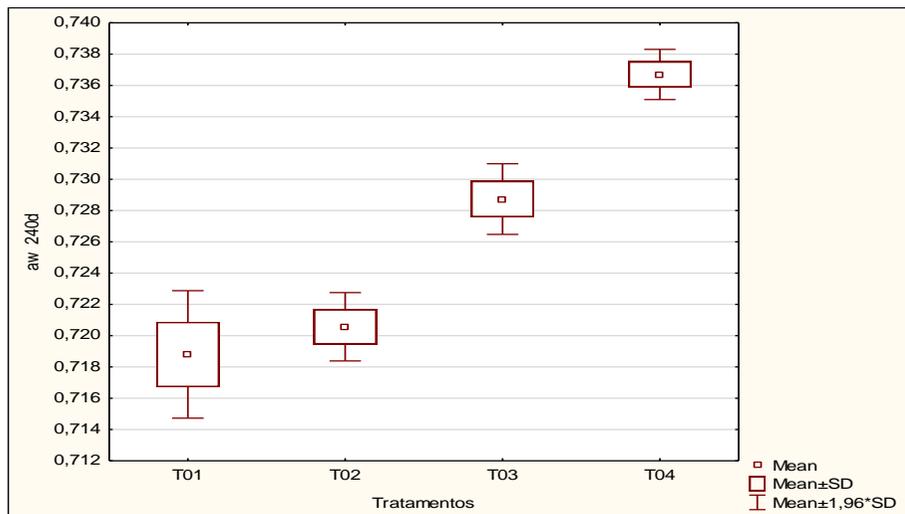
Amostra	Dias	Ácido Acético g/L	Ácido Láctico g/L	Frutose g/L	Glicose g/L	Sacarose g/L	Etanol g/L	HMF g/L
T03	15	0,507	0,336	332,950	320,819	0,000	0,209	**
	30	0,659	0,383	332,266	321,041	0,000	0,215	**
	60	0,607	0,339	331,641	322,087	0,000	2,064	**
	90	0,279	0,288	332,859	303,885	13,967	1,654	0,0040
	120	0,266	0,279	325,729	302,202	13,938	1,889	0,0040
	150	0,520	0,511	330,837	306,877	14,676	4,752	0,0060
	180	0,499	0,804	320,830	294,286	8,671	4,073	0,0177
	210	0,508	0,859	342,054	310,161	7,650	4,227	0,0184
	240	0,489	0,760	288,760	269,873	6,755	4,191	0,0074
	270	0,343	0,633	232,929	213,846	5,248	3,818	0,0074
	300	0,451	0,761	339,238	308,883	8,134	4,008	0,0157
	330	0,336	0,489	350,524	325,182	11,800	3,708	0,0193
	360	0,445	0,469	349,255	335,252	10,869	2,780	0,0262
T04	15	0,504	0,343	332,161	321,583	0,000	0,000	**
	30	0,638	0,371	332,476	321,286	0,000	0,276	**
	60	0,591	0,374	337,586	312,279	0,000	0,000	**
	90	0,283	0,254	341,281	305,025	12,261	0,000	0,0020
	120	0,288	0,309	339,266	303,680	13,525	0,000	0,0020
	150	0,590	0,550	340,592	309,214	17,266	0,000	0,0020
	180	0,590	1,025	362,845	223,936	4,977	0,000	0,0004
	210	0,603	1,071	381,597	244,155	5,375	0,000	0,0004
	240	0,613	1,073	386,268	251,412	5,439	0,000	0,0005
	270	0,590	1,047	365,142	237,962	5,251	0,000	0,0003
	300	0,456	0,874	314,170	230,146	4,380	0,000	0,0001
	330	0,391	0,439	355,098	318,276	10,924	0,000	0,0000
	360	0,703	0,748	393,915	262,686	11,559	0,000	0,0007

** Análise não realizada.

10 ANEXOS

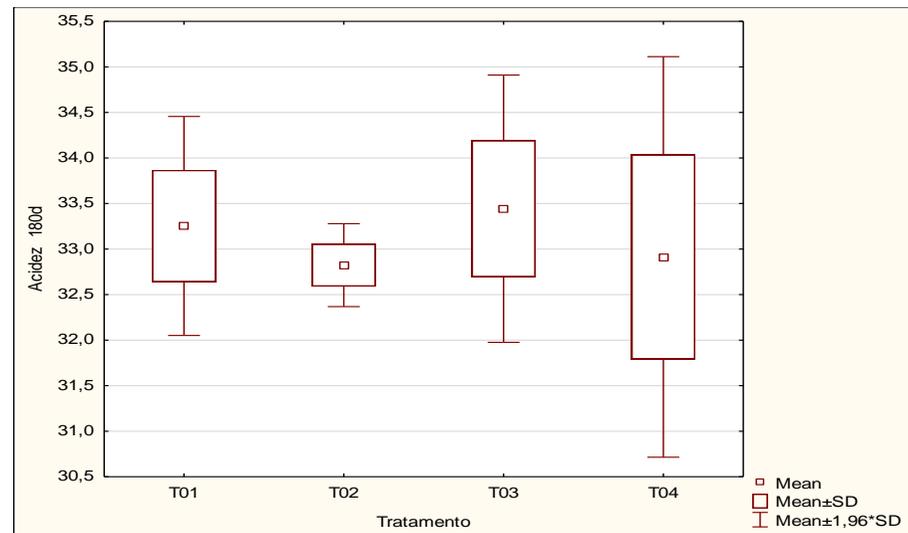
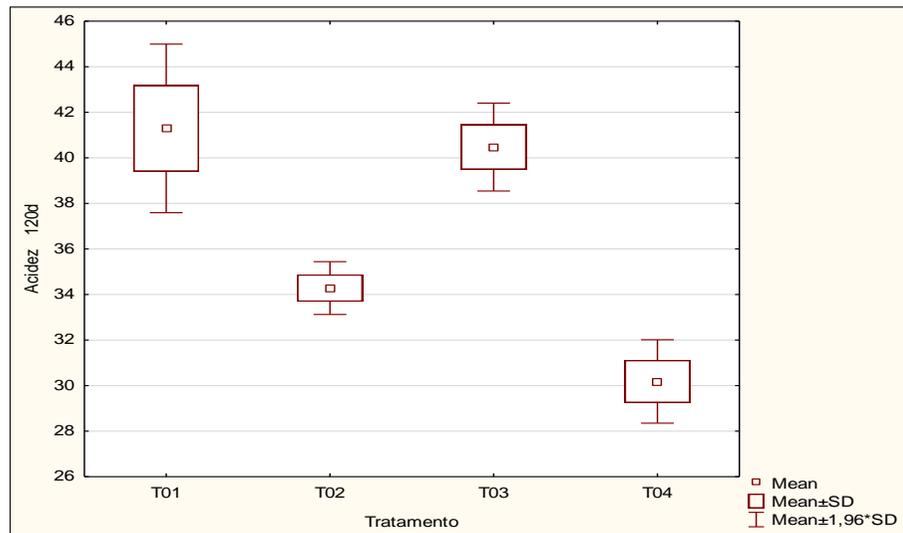
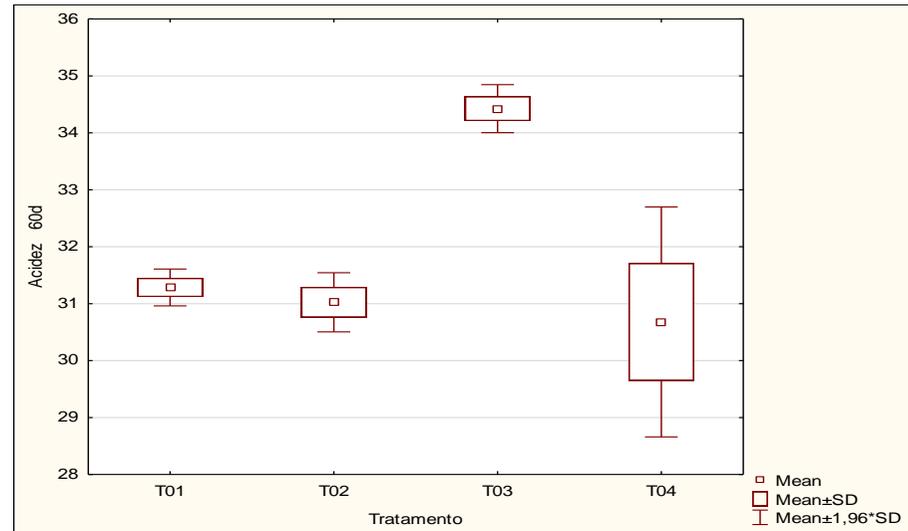
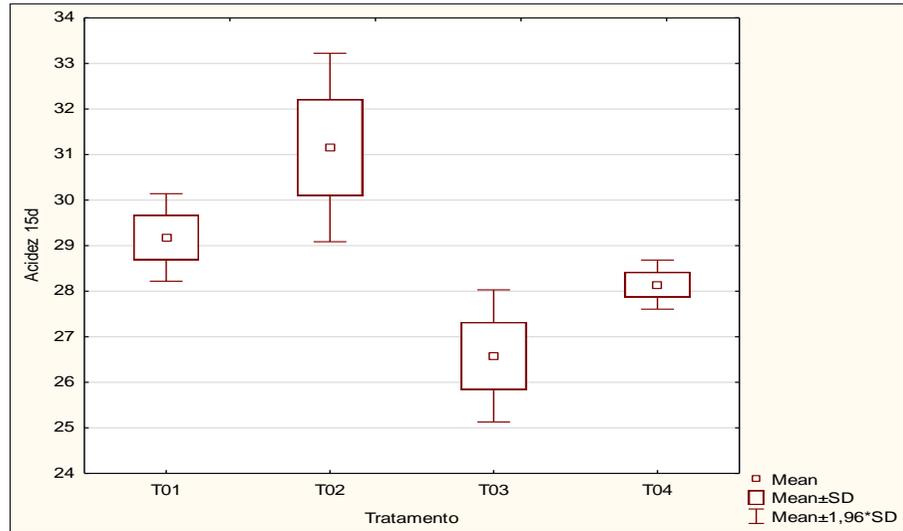
ANEXO A - Análise estatística realizada entre os quatro testes ao longo do armazenamento para análise de atividade de água.

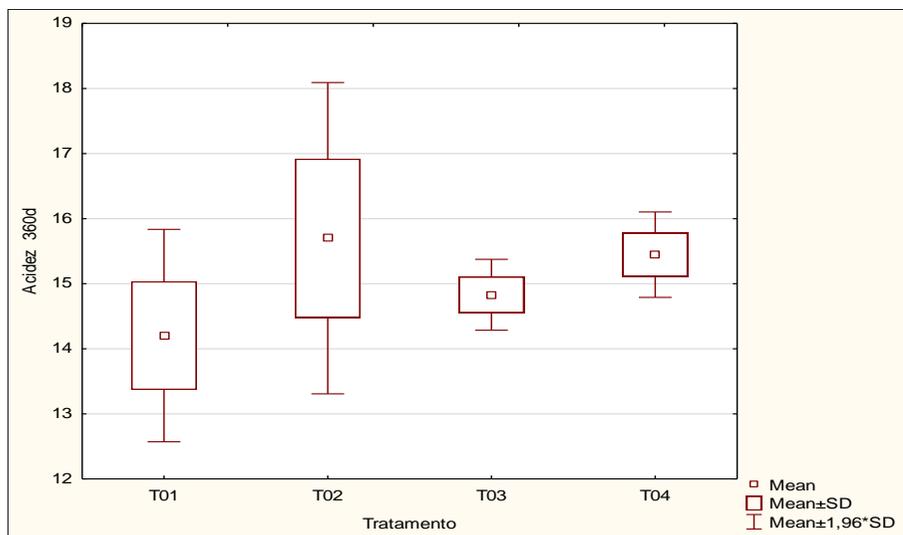
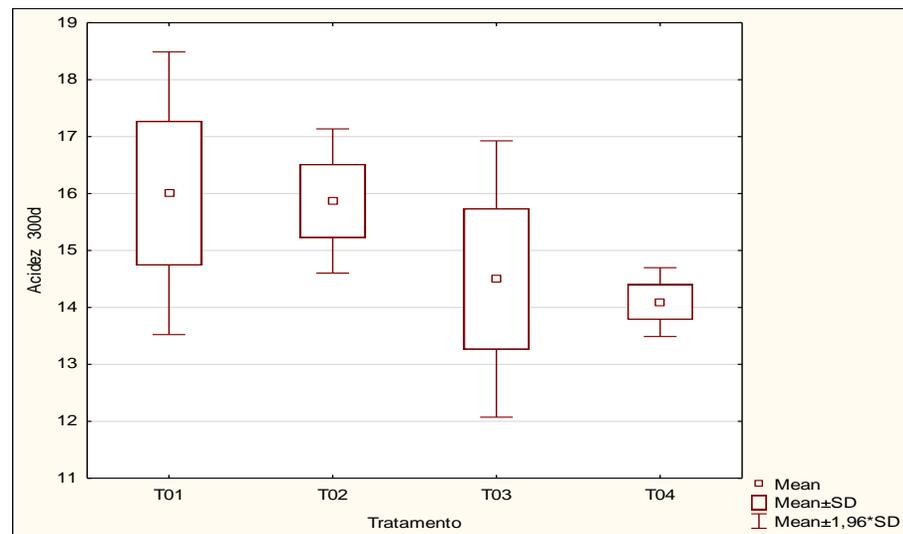
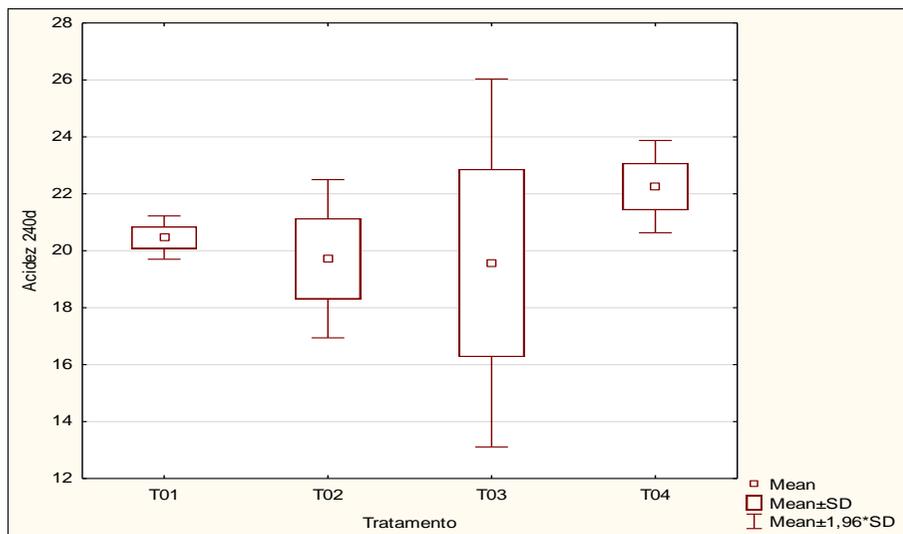




Fonte: (STATSOFT, 2016).

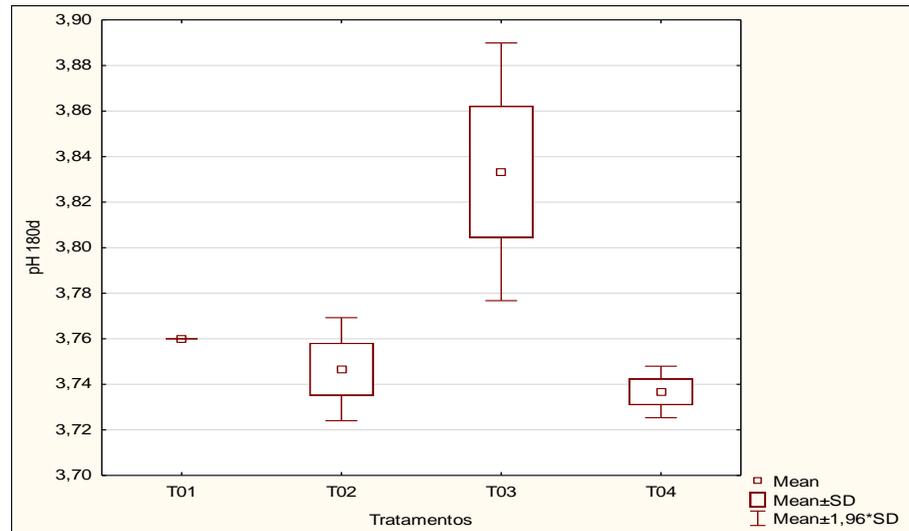
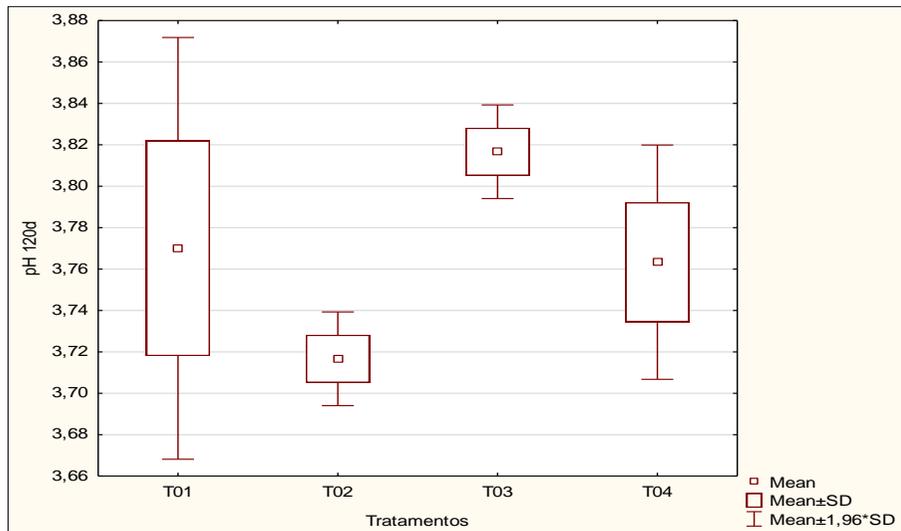
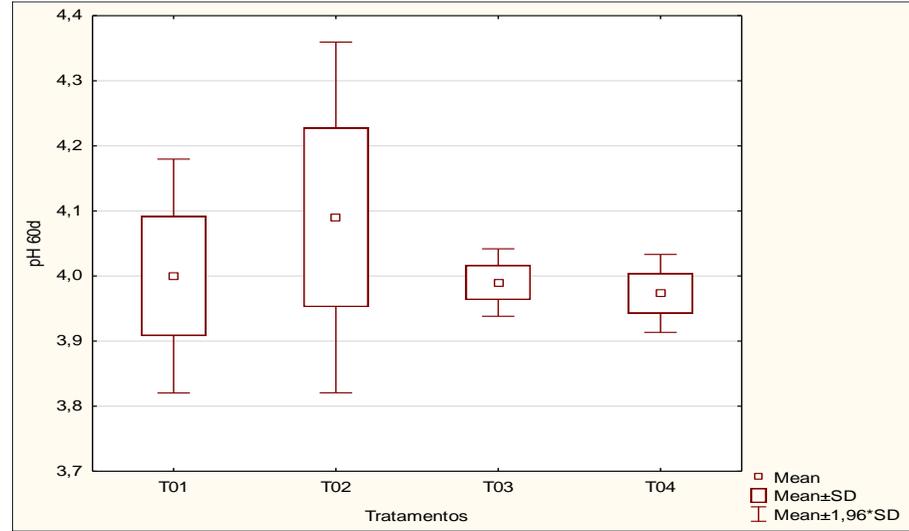
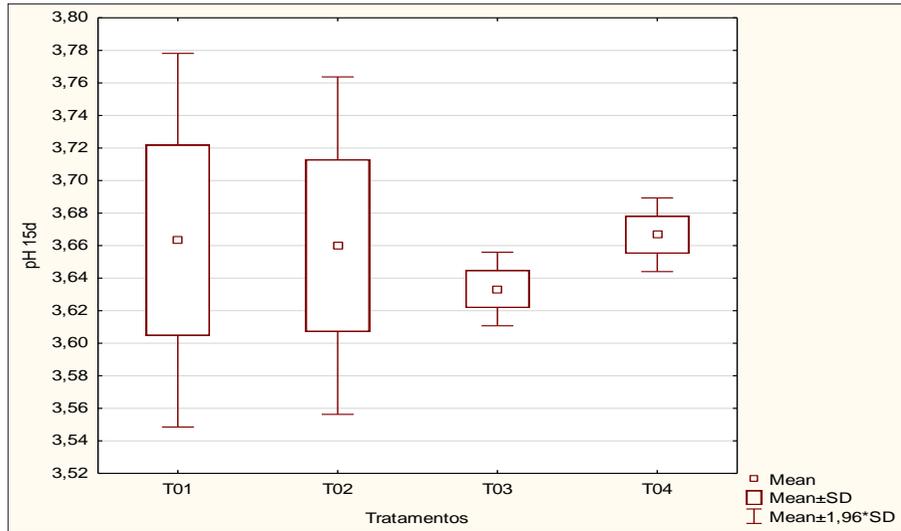
ANEXO B - Análise estatística realizada entre os quatro testes ao longo do armazenamento para análise de acidez livre.

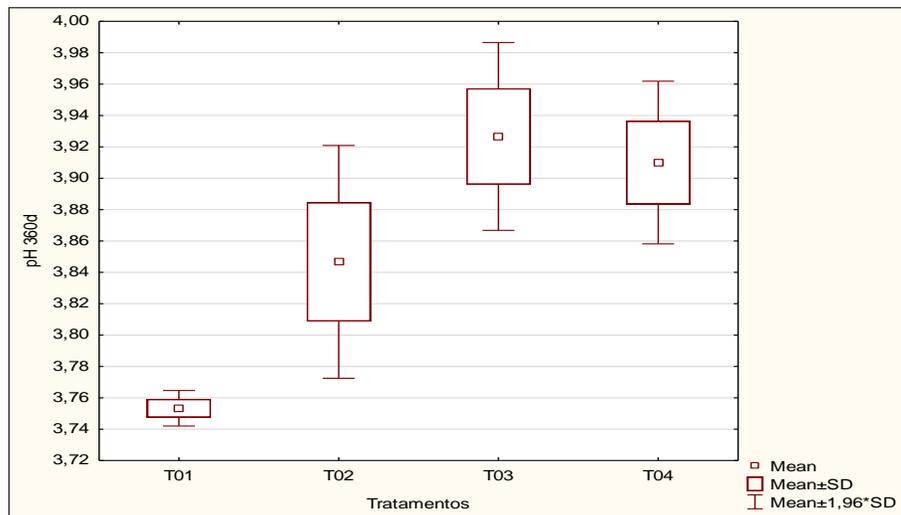
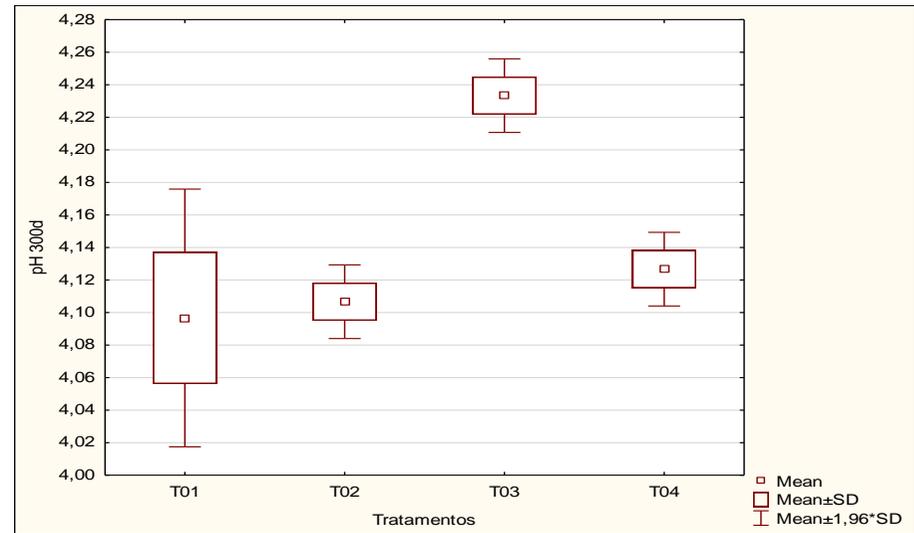
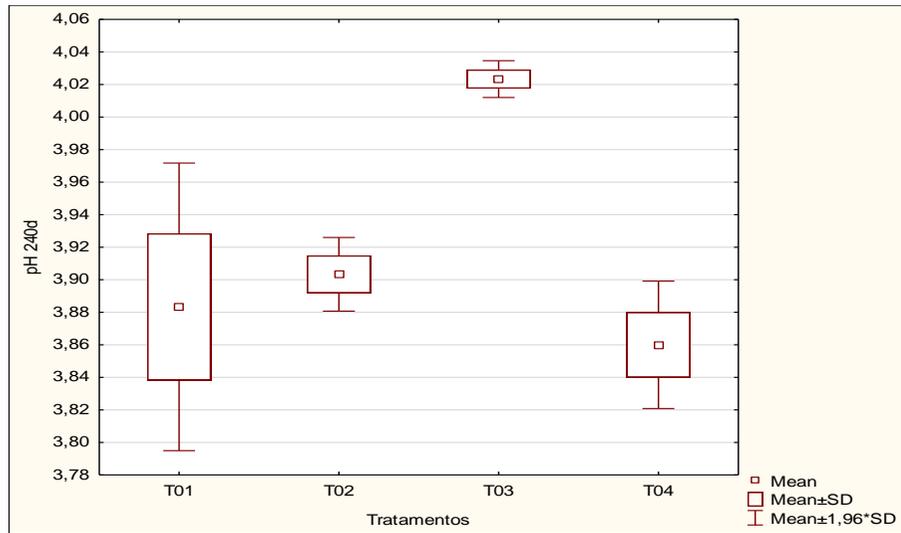




Fonte: (STATSOFT, 2016).

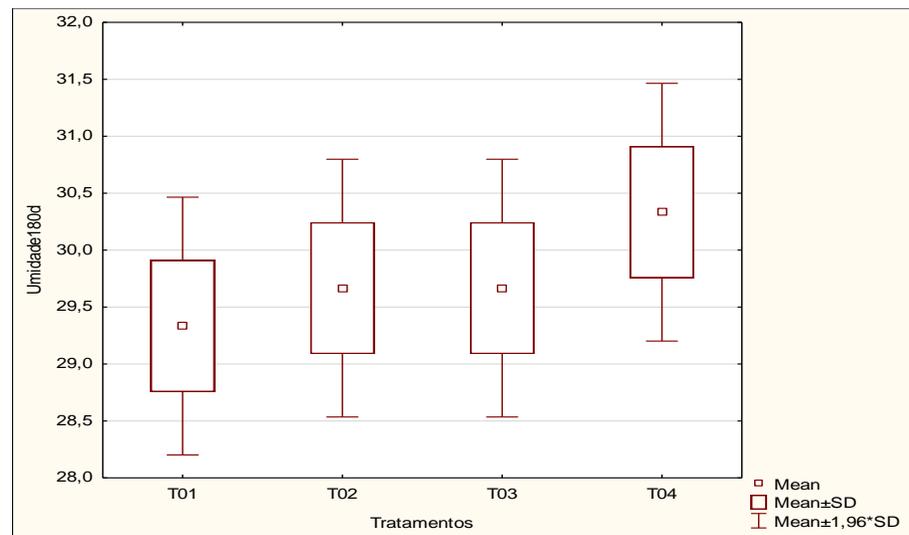
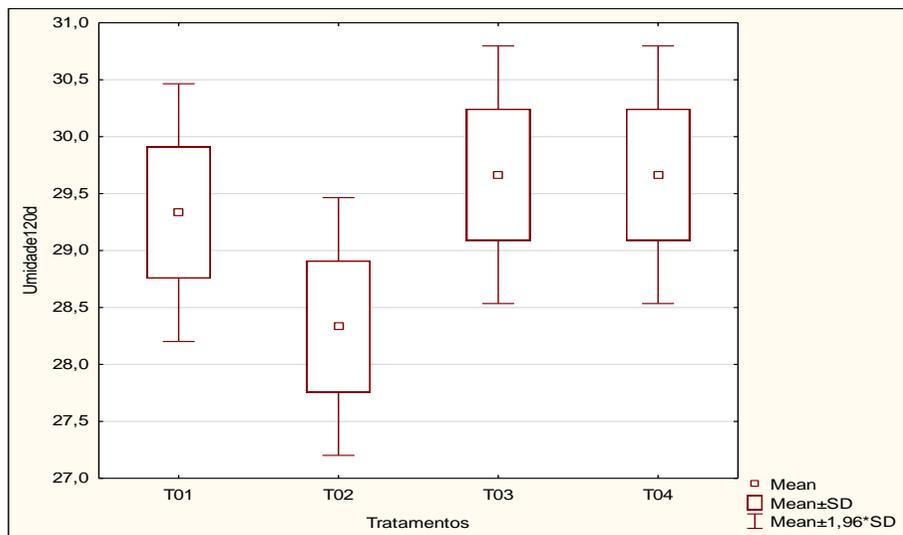
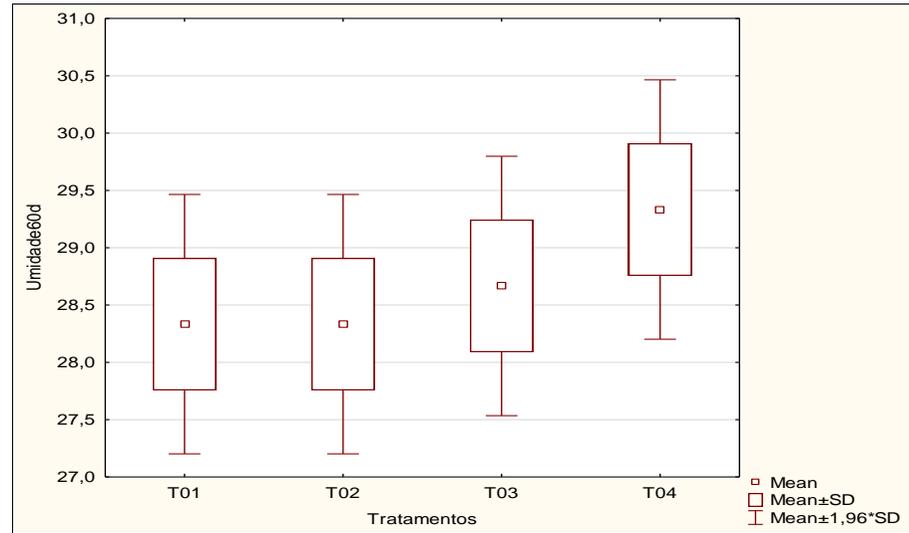
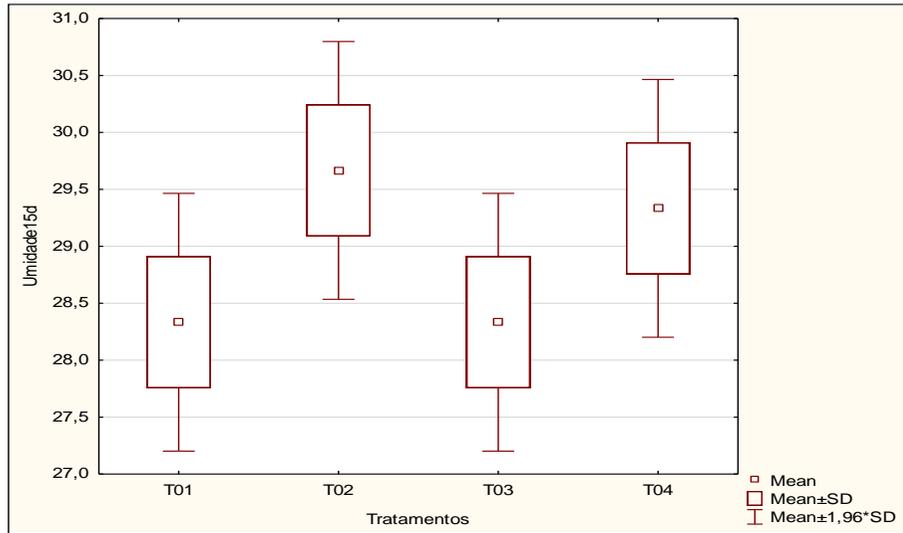
ANEXO C - Análise estatística realizada entre os quatro testes ao longo do armazenamento para análise de pH.

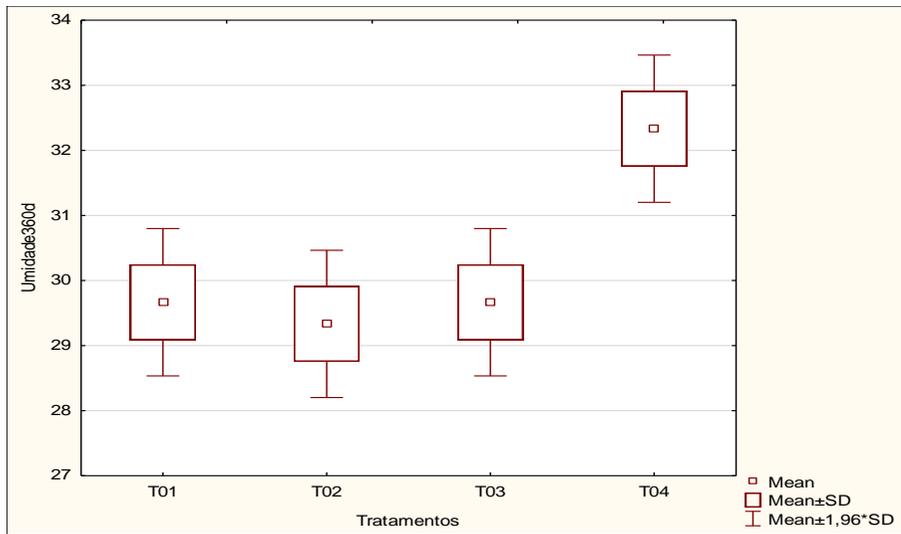
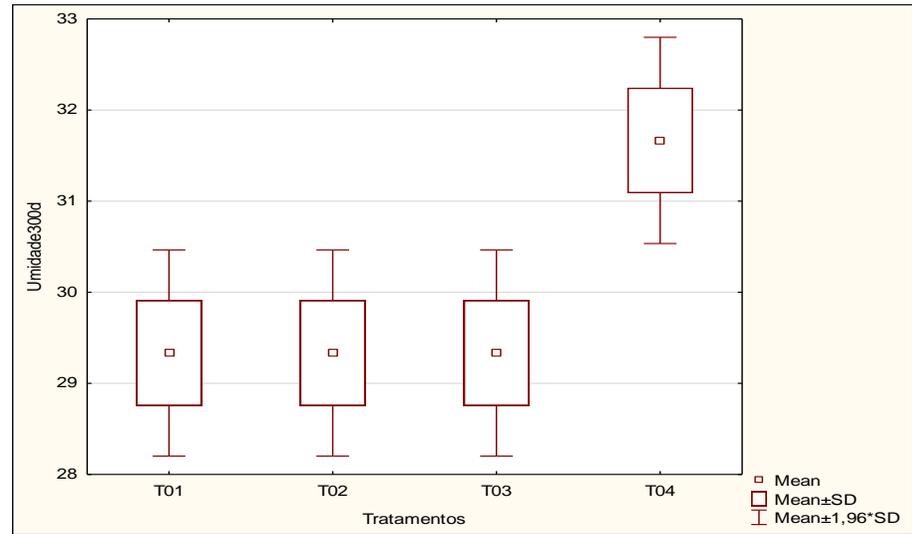
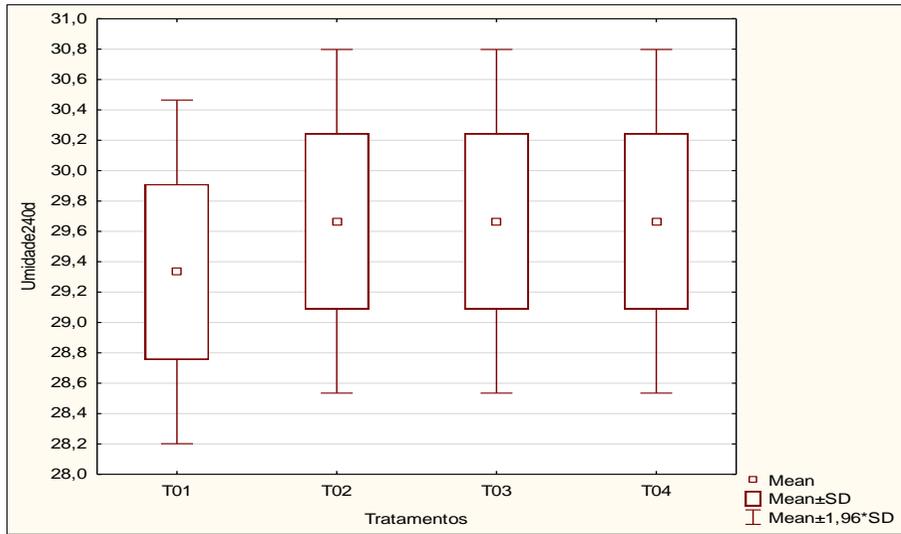




Fonte: (STATSOFT, 2016).

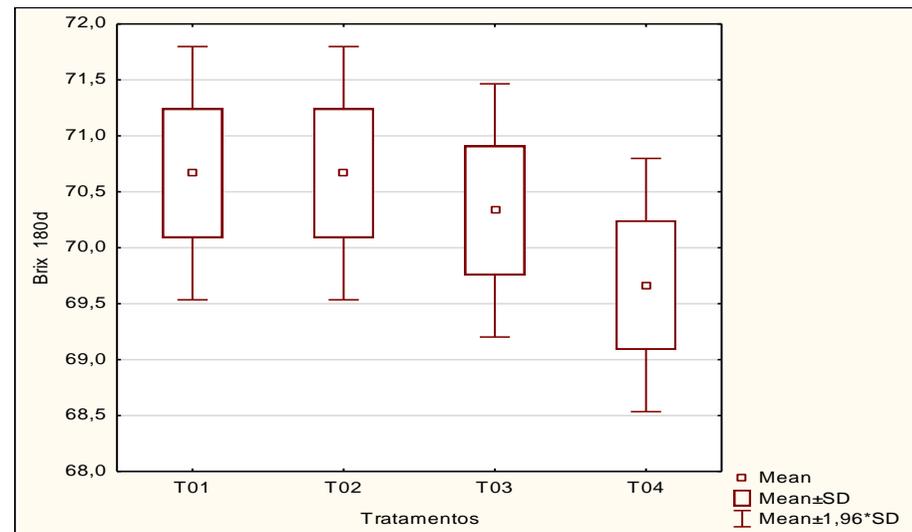
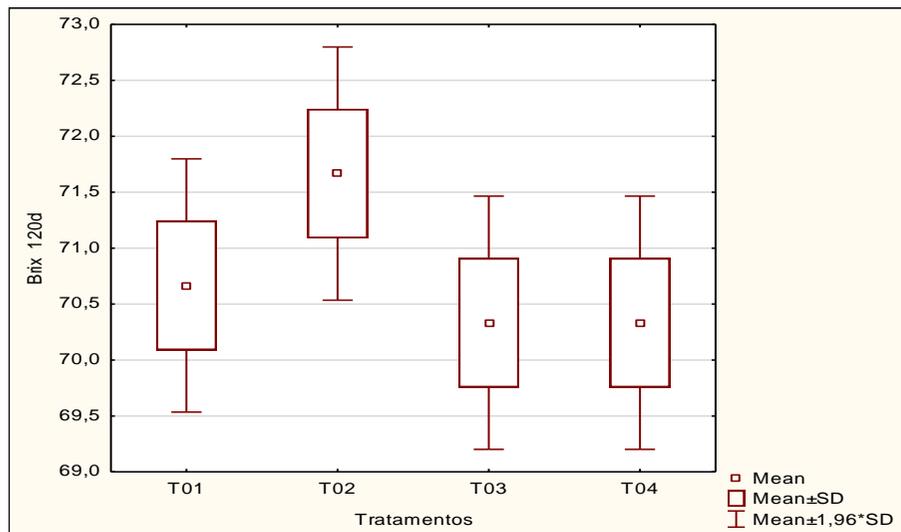
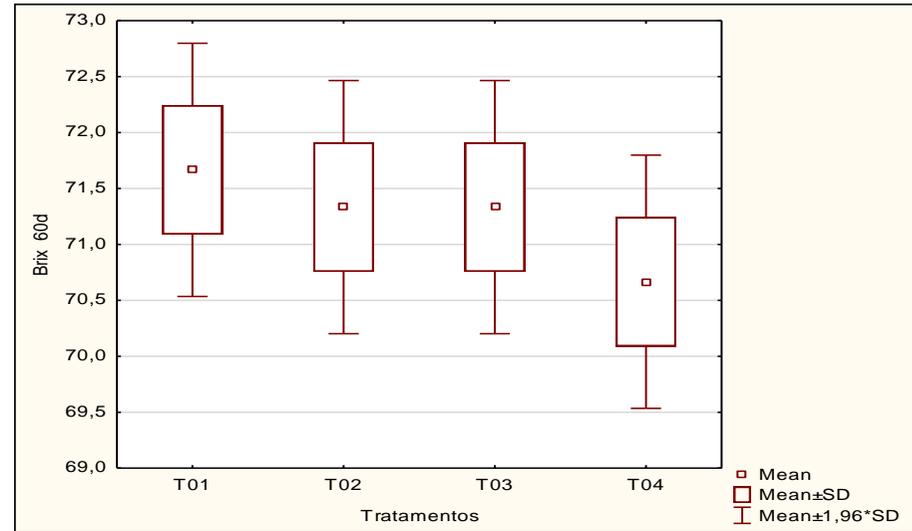
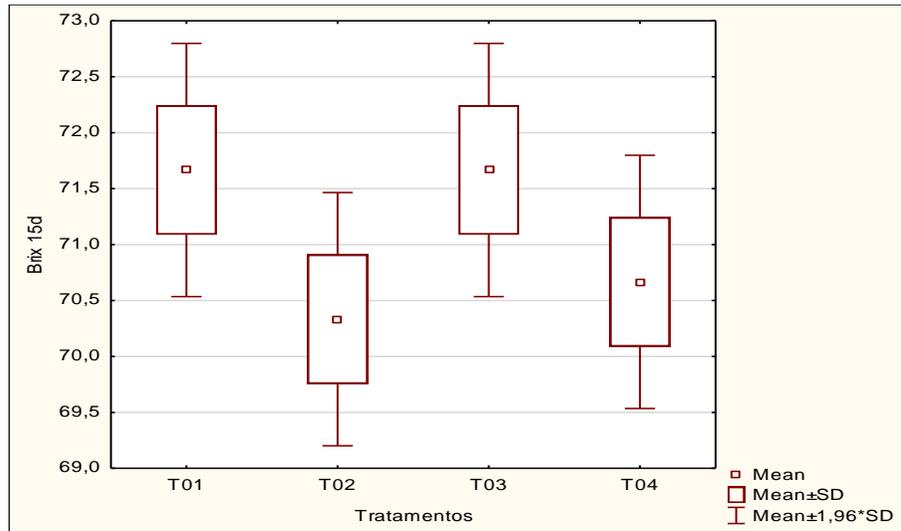
ANEXO D - Análise estatística realizada entre os quatro testes ao longo do armazenamento para análise de umidade.

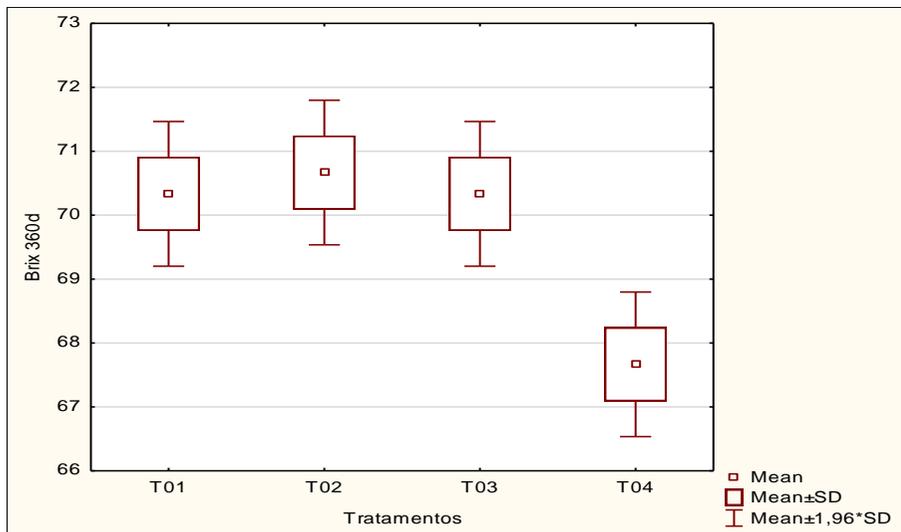
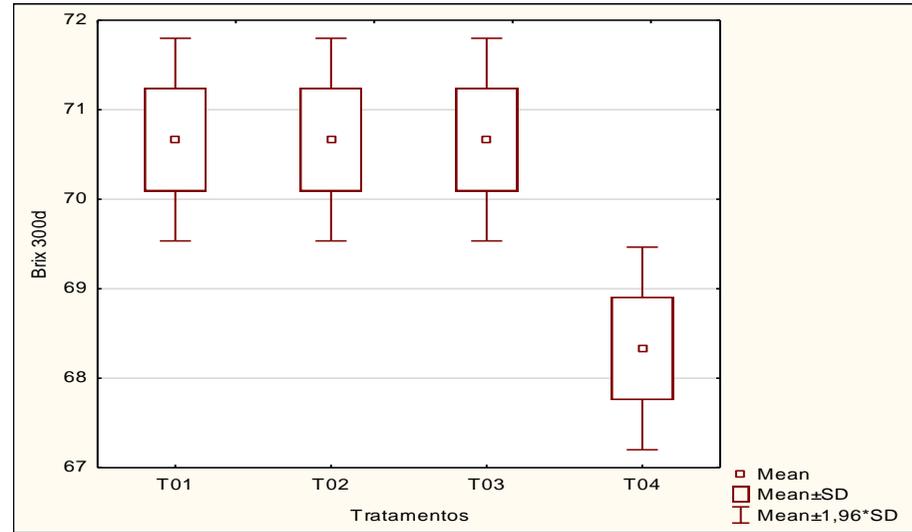
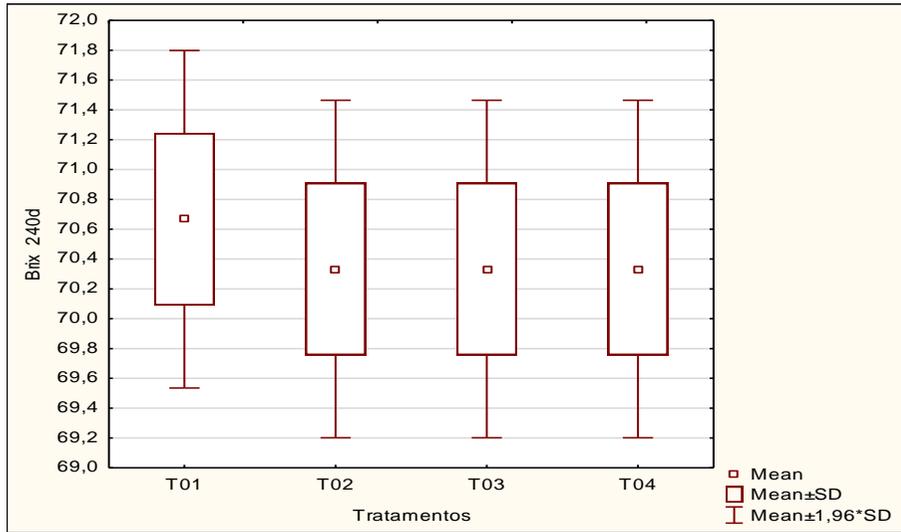




Fonte: (STATSOFT, 2016).

ANEXO E - Análise estatística realizada entre os quatro testes ao longo do armazenamento para análise de sólidos solúveis.





Fonte: (STATSOFT, 2016).